

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA FARMACEUTICKEJ BOTANIKY

---

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Alkaloidy *Vinca minor* L. a jejich biologická aktivita I.

Vedúci diplomovej práce: PharmDr. Jakub Chlebek, Ph.D.

Vedúci katedry: doc. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Hradec Králové, 2019

Martina Jurkaninová

CHARLES UNIVERSITY  
FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRALOVE  
DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL BOTANY

---

DIPLOMA THESIS

*Vinca minor* L. alkaloids and their biological activity I.

Supervisor: PharmDr. Jakub Chlebek, Ph.D.

Head of Department: doc. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Hradec Králové, 2019

Martina Jurkaninová

Chcela by som sa veľmi pekne poďakovať hlavne vedúcemu mojej diplomovej práce PharmDr. Jakubovi Chlebkovi, Ph.D. za všetku pomoc a odborné vedenie pri celej mojej práci, za poskytnutie potrebných materiálov, užitočných rád, za ústretový prístup, pomoc a za trpezlivosť pri práci v laboratóriu. Ďalej ďakujem doc. PharmDr. Jiřimu Kunešovi, PhD. za zmeranie a interpretáciu NMR spektier, prof. RNDr. Lubomírovi Opletalovi, CSc. za zmeranie biologickej aktivity izolovaných alkaloidov. Ďakujem aj celému kolektívu na Katedre farmaceutickej botaniky za pomoc a ústretový prístup pri práci v laboratóriu. A v neposlednom rade by som chcela poďakovať svojej rodine, priateľovi a kamarátke Slávke za podporu a trpezlivosť počas celého štúdia.

Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje z ktorých som pri spracovaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci sú riadne citované. Práca nebola využitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.

V Hradci Králové, 2019

Martina Jurkaninová

## OBSAH

PREHĽAD OBRÁZKOV.....	9
PREHĽAD TABULIEK .....	10
ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK .....	11
1 ÚVOD .....	12
2 CIEĽ PRÁCE.....	14
3 TEORETICKÁ ČASŤ.....	15
3.1 Alzheimerova choroba.....	15
3.1.1 Epidemiológia.....	15
3.1.2 Formy Alzheimerovej choroby .....	15
3.1.3 Rizikové faktory.....	16
3.1.4 Diagnostika.....	16
3.1.5 Klinický obraz .....	17
3.1.6 Štádiá choroby .....	17
3.1.7 Neuropatologické zmeny .....	18
3.1.7.1 Senilné plaky.....	18
3.1.7.2 Neurofibrilárne kľbká.....	18
3.1.8 Cholinergný systém v AD .....	19
3.1.9 Farmakoterapia Alzheimerovej choroby .....	19
3.1.9.1 Inhibítory cholinesteráz.....	20
3.1.9.2 Antagonisti NMDA-receptorov.....	21
3.1.9.3 Doplnková liečba .....	22
3.1.10 Potencionálne terapeutické ciele .....	23
3.1.10.1 Anti-amyloidná terapia.....	23
3.1.10.2 Imunoterapia.....	24

3.1.10.3 Plazmaferéza .....	24
3.1.10.4 Agonisti jadrového transkripčného faktoru PPAR $\gamma$ .....	24
3.1.10.5 Látky ovplyvňujúce mitochondriálne funkcie .....	25
3.1.10.8 PBT2.....	25
3.1.10.9 Ďalšie potencionálne terapeutické ciele .....	25
3.2 <i>Vinca minor</i> L. ....	26
3.2.1 Taxonómia.....	26
3.2.2 Čeľad' Apocynaceae.....	26
3.2.3 Rod <i>Vinca</i> .....	27
3.2.4 Popis <i>Vinca minor</i> L. ....	27
3.2.7 Biologická aktivita obsahových látok <i>Vinca minor</i> L. ....	32
3.2.8 Využitie ďalších <i>Vinca</i> alkaloidov v terapii .....	34
4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ .....	37
4.1 Materiál a chemikálie .....	37
4.1.1 Rozpúšťadlá a chemikálie.....	37
4.1.2 Pomocné látky.....	37
4.1.3 Detekčné činidlá.....	38
4.1.4 Vyvíjacie sústavy pre tenkovrstvú chromatografiu .....	38
4.1.5 Chromatografické absorbenty .....	38
4.1.6 Prístrojové vybavenie.....	38
4.2 Všeobecné postupy .....	39
4.2.1 Príprava a čistenie rozpúšťadiel .....	39
4.2.2 Odparovanie rozpúšťadiel.....	39
4.2.3 Sušenie a uchovávanie izolovaných látok .....	39
4.2.4 Príprava sklenených dosiek pre preparatívnu tenkovrstvú chromatografiu .....	39

4.2.5 Stĺpcová chromatografia .....	39
4.2.6 Tenkovrstvá chromatografia .....	40
4.2.7 Detekcia alkaloidov .....	40
4.3 Analýza štruktúry .....	40
4.3.1 GC-MS analýza .....	40
4.3.2 ESI-MS analýza .....	40
4.3.3 NMR analýza .....	41
4.3.4 Optická otáčavosť .....	41
4.4 Izolácia alkaloidov .....	41
4.4.1 Rastlinný materiál .....	41
4.4.2 Príprava alkaloidného extraktu a stĺpcová chromatografia predčisteného chloroformového výtrepku CHCl <sub>3</sub> -A .....	42
4.4.3 Stĺpcová chromatografia frakcie VM 323-327 .....	42
4.5 Stanovenie biologickej aktivity .....	45
4.5.1 Stanovenie cholinesterázovej aktivity .....	45
4.5.1.1 Použité chemikálie .....	45
4.5.1.2 Pufry .....	45
4.5.1.3 Prístroje .....	45
4.5.1.4 Biologický materiál .....	46
4.5.1.5 Príprava hemolyzátu a plazmy .....	46
4.5.1.6 Stanovenie cholinesterázovej inhibičnej aktivity (IC <sub>50</sub> ) .....	46
4.5.2 Stanovenie inhibície prolyl oligopeptidázy (POP) .....	47
4.5.2.1 Použité chemikálie .....	47
4.5.2.2 Prístroje .....	47
4.5.2.3 Stanovenie inhibičnej aktivity testovaných látok voči POP .....	48

5 VÝSLEDKY.....	49
5.1 Štruktúrna analýza.....	49
5.1.1 (–)-Vinoxin (MJ-1) .....	49
5.1.1.1 GC-MS analýza .....	49
5.1.1.2 ESI-MS analýza.....	49
5.1.1.3 NMR analýza.....	49
5.1.1.4 Optická otáčavosť.....	50
5.1.2 (±)-Vinoxín (MJ-2).....	50
5.1.2.1 GC-MS analýza.....	50
5.1.2.2 ESI-MS analýza.....	50
5.1.2.3 NMR analýza.....	50
5.1.2.4 Optická otáčavosť.....	50
5.2 Inhibičná aktivita izolovaných alkaloidov .....	51
6 DISKUSIA.....	52
7 POUŽITÁ LITERATÚRA.....	53
8 ABSTRAKT .....	60
9 ABSTRACT .....	61



## PREHĽAD OBRÁZKOV

Obr. 1 Vzorec huperzínu A .....	21
Obr. 2 Vzorec memantínu .....	22
Obr. 3 <i>Vinca minor</i> L. – kvet .....	28
Obr. 4 Vzorec vinkarubínu .....	29
Obr. 5 Vzorec minovincínu .....	30
Obr. 6 Vzorec pikrinínu.....	30
Obr. 7 Vzorec rezerpínu a vzorec vinkamínu .....	31
Obr. 8 Vzorec vinkatínu .....	31
Obr. 9 Vzorec vinorínu a vzorec vinkamidínu .....	32
Obr. 10 Vzorec vinkamínu .....	33
Obr. 11 Vzorec vinpocetínu .....	34
Obr. 12 Vzorec vinkristínu .....	34
Obr. 13 Vzorec vinblastínu .....	35
Obr. 14 Vzorec vindesínu .....	35
Obr. 15 Vzorec vinorelbínu.....	36
Obr.16 Vzorec vinflunínu.....	36
Obr. 17 TLC spojených podfrakcií alkaloidného extraktu frakcie VM 323 – 327 .....	43
Obr. 18 (–)-Vinoxín .....	49
Obr. 19 (±)-Vinoxín .....	50

## PREHĽAD TABULIEK

Tabuľka 1 Taxonomické zaradenie .....	26
Tabuľka 2 Biologická aktivita alkaloidov <i>Vinca minor</i> L.....	32
Tabuľka 3 Stĺpcová chromatografia spojených frakcií VM 323 – 327 .....	43
Tabuľka 4 Výsledky inhibičných aktivít izolovaných alkaloidov .....	51

## ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

A $\beta$	$\beta$ -amyloid
AD	Alzheimerova choroba (Alzheimer's disease)
ACh	acetylcholín
AChE	acetylcholinesteráza
ApoE	apolipoproteín E
APP	amyloidný prekursorový proteín
BChE	butyrylcholinesteráza
FAD	familiárna Alzheimerova choroba (familial Alzheimer's disease)
GSK-3 $\beta$	glykogénsyntáza kináza 3 $\beta$
ChAT	cholínacetyltransferáza
iChE	inhibítor cholinesteráz
iAChE	inhibítor acetylcholinesterázy
iBChE	inhibítor butyrylcholinesterázy
LPS	lipolylpolysacharid
NMDA	<i>N</i> -metyl-D-aspartát
POP	prolyl oligopeptidáza
PPAR $\gamma$	receptor aktivovaný proliferátormi peroxizómov
TLC	tenkovrstvá chromatografia

## 1 ÚVOD

Neustály pokrok v zlepšovaní zdravotnej starostlivosti prispieva k tomu, že ľudia sa dožívajú vyššieho veku a populácia stárne. To je dôvod, ktorý spôsobuje narastajúci počet ľudí postihnutých demenciou. Demencia je na celom svete jednou z hlavných príčin zdravotného postihnutia, najmä starších ľudí. Má výrazný fyzicky, psychologicky a ekonomický dopad nielen na ľudí, ktorých postihuje, ale aj ich opatrovateľov, rodiny a spoločnosť. V roku 2018 bol počet ľudí trpiacich Alzheimerovou chorobou 50 miliónov, v roku 2050 tento počet vzrastie až na viac ako trojnásobok a odhaduje sa približne 152 miliónov prípadov ochorenia.[1,2]

Alzheimerova choroba je najrozšírenejším typom demencie a predstavuje 60 až 80 % z celkového počtu prípadov demencie na celom svete. Je to viacfaktorové, neurodegeneratívne, progresívne ochorenie, kedy dochádza v mozgovej kôre a hippocampe k strate neurónov.[3]

Od roku 1998 bolo testovaných viac ako 100 liečiv na liečbu Alzheimerovej choroby, avšak len 4 z nich boli schválené na liečbu. V súčasnosti existujú dve skupiny liečiv, ktorých cieľom je liečiť symptómy. Sú to inhibítory acetylcholinesterázy – donepezil, rivastigmín a galantamín, ktorých mechanizmom účinku je zabrániť enzýmu acetylcholinesteráze rozkladať acetylcholín. Druhou skupinou sú antagonisti *N*-metyl-D-aspartátových receptorov, ktoré blokujú účinky glutamátu. Ten sa v nadmernom množstve dostáva do mozgu a spôsobuje poškodenie neurónov. Jediným zástupcom je memantín.[2]

Inhibítory acetylcholinesterázy sú dôležitou terapeutickou stratégiou pri liečbe Alzheimerovej choroby a keďže inhibítory rivastigmín a galantamín súvisia s prírodnými látkami, výsumné skupiny sa zamerali na prirodzene sa vyskytujúce zlúčeniny v rastlinách ako na potenciálne zdroje nových alebo účinnejších inhibítorov acetlycholinesterázy. Ich štúdie viedli k objaveniu dôležitého počtu sekundárných metabolitov a rastlinných extraktov so schopnosťou inhibovať acetylcholinesterázu.[4] Najpočetnejšie skúmanými metabolitmi zodpovednými za anticholinesterázovú aktivitu sú alkaloidy a práve tie môžu slúžiť ako východiskové látky pri syntéze nových inhibítorov cholinesteráz.[5]

Výskumná skupina ADINACO, ktorá pôsobí na katedre farmaceutickej botaniky sa zaoberá štúdiom látok izolovaných z rastlín, konkrétne ich účinkami na patofyziologické procesy ovplyvňujúce rozvoj Alzheimerovej choroby. Uskutočňuje sa izolácia a identifikácia látok a stanovuje sa biologická aktivita enzýmov v CNS.[6]

Významnou rastlinou z čeľade Apocynaceae, bohatou na indolové alkaloidy je aj *Vinca minor* L.[7] Na základe screeningu potenciálnych inhibítorov cholinesteráz rastlinného pôvodu bola v skupine ADINACO zistená významná selektívna inhibičná aktivita alkaloidného extraktu z *Vinca minor* L. voči butyrylcholinesteráze. Náplňou mojej diplomovej práce bolo štúdium alkaloidov na tento enzým, pretože inhibícia butyrylcholinesterázy predstavuje potenciálny terapeutický zásah u tejto choroby.

## 2 CIEĽ PRÁCE

Ciele diplomovej práce:

1. Izolácia aspoň jedného alkaloidu v čistej forme z pridelenej frakcie pomocou chromatografických metód
2. Podiel na identifikácii a určení štruktúry izolovaného alkaloidu spektrálnymi metódami, určení optickej otáčavosti, prípadne teploty topenia izolovaných alkaloidov.
3. Podiel na stanovení biologickej aktivity izolovaných alkaloidov na inhibíciu acetylcholínerázy, butyrylcholínerázy a prolyl oligopeptidázy.
4. Spracovanie získaných výsledkov, ich rozbor a vyhodnotenie.

## **3 TEORETICKÁ ČASŤ**

### **3.1 Alzheimerova choroba**

Alzheimerova choroba (AD) je progresívne, neurodegeneratívne ochorenie s charakteristickými neuropatologickými zmenami.[8] AD je najčastejšou príčinou demencie v strednom a vyššom veku. Hlavnou príčinou, ktorá spôsobuje tento stav je narastajúce starnutie obyvateľstva. Je spojená s výrazným fyzickým, sociálnym a psychologickým postihnutím pacientov.[9] Chorobu ako prvý popísal doktor Alois Alzheimer v roku 1906.[10]

#### **3.1.1 Epidemiológia**

AD v súčasnosti postihuje najmenej 5 miliónov ľudí v Európe. Je najčastejším typom demencie v starobe a predstavuje 50 – 60 % všetkých demencií Alzheimerovho typu. Svetová zdravotnícka organizácia (WHO) ju zaraďuje medzi desať hlavných smrteľných ochorení a s prehlbujúcim starnutím obyvateľstva sa riziko vzniku tohto ochorenia zvyšuje. Štatistiky západnejších krajín ju radia na štvrté miesto najčastejších príčin úmrtia. Na Slovensku sa odhaduje počet pacientov na 40 000 až 50 000. Najčastejšie sa diagnostikuje u ľudí starších ako 65 rokov a viac sa vyskytuje u žien ako u mužov.[9] V Českej republike žije s touto formou demencie okolo 150 000 ľudí. Viac ako dve tretiny z tohto počtu tvorí ženské pohlavie.[11]

#### **3.1.2 Formy Alzheimerovej choroby**

Forma skorého nástupu sa vyskytuje u ľudí mladších ako 65 rokov. Sú vo veku 40 až 50 rokov, keď im je diagnostikovaná. Je zriedkavá, má ho len 5 % všetkých ľudí. Ľudia s Downovým syndrómom majú vyššie riziko vzniku. Vedci zistili niekoľko spôsobov, ktorými sa AD v ranom štádiu odlišuje od iných foriem tohto ochorenia. Ľudia, ktorí majú tendenciu mať viacero zmien na mozgu, sú spájaní s AD. Forma skorého nástupu sa tiež zdá byť spojená s defektom na 14. chromozóme. Najbežnejšia forma ochorenia je s neskorým nástupom. Objaví sa ľudom vo veku 65 a viac rokov. Môže, ale nemusí byť dedičná. Zatiaľ sa nenašiel konkrétny gén, ktorý ju spôsobuje. Nie je známe, prečo na ňu niektorí ľudia ochorejú a iní nie.[12]

Familiárna Alzheimerova choroba (FAD) je formou AD, ktorá je spájaná s poruchou génov. V rodinách, kde sa vyskytuje postihla najmenej dve generácie. FAD tvorí menej ako 1 % všetkých prípadov AD. Väčšina ľudí, ktorí majú formu skorého nástupu AD, majú FAD.[12]

### **3.1.3 Rizikové faktory**

Rozhodujúcim a neovplyvniteľným rizikovým faktorom AD je vek. Prítomnosť apolipoproteínu E4 (ApoE4) je druhým najdôležitejším faktorom. Riziko vzniku AD u ľudí bez alel pre ApoE4 je asi 9 %. Ďalšie rizikové faktory pre vznik AD je jej výskyt v rodine alebo výskyt Downonvho syndrómu v rodine. Ten spôsobuje trizómia 21. chromozómu a práve na tomto chromozóme sa nachádza gén pre tvorbu ApoE4. Produkuje sa väčšie množstvo  $\beta$ -amyloidu ( $A\beta$ ) a tvorí sa viac plakov.[13] Čiastočne ovplyvniteľnými rizikovými faktormi sú metabolický syndróm (obezita, hypertenzia, zvýšený cholesterol, diabetes), fajčenie, nadmerné požívanie alkoholu a opakované úrazy hlavy v anamnéze.[14] Mezi ďalšie faktory patrí ženské pohlavie a nižší stupeň dosiahnutého vzdelania.[15] Epidemiologické štúdie poukázali na možný toxický vplyv hliníka, ktorý môže iniciovať rozvoj AD. Rizikové môžu byť aj vaskulárne ochorenia alebo hypoxicko-ischemické zmeny mozgu.[16]

### **3.1.4 Diagnostika**

Najprv je potrebné stanoviť diagnózu demencie a to na základe klinických, anamnestických údajov a testových vyšetrení. Zo screeningových testov je najviac používaný Mini-Mental State Examination test, ďalej je to test kreslenia hodín, ktorý je pre AD špecifickejší. Užitočné sú zložitejšie testy kognitívnych funkcií, najmä Alzheimer's disease Assesment Scale test. Pre diagnostiku je dôležitý priebeh a klinický obraz demencie – pomalá progresia, poruchy epizodickej pamäti, skorý úpadok osobnosti a iné. Pre potvrdenie diagnózy sú využívané tzv.markery choroby. V likvore je zmenený pomer niektorých proteínov – zvýšená hladina  $\tau$ -proteínu, fosforylovaného  $\tau$ -proteínu a znížená hladina  $A\beta$ . [17] Zobrazovacími metódami, ktorými sú výpočtová tomografia a magnetické rezonančné zobrazenie je zistená atrofia mediálnych temporálnych štruktúr – hipokampu a amygdaly. Ďalšími zobrazovacími metódami sú vyšetrenia emisnou pozitronovou tomografiou alebo emisnou jednoprotónovou



tomografiou, ktoré zisťujú, kde je v mozgu porušený krvný prietok a metabolizmus. U AD sú najväčšie ložiska hypometabolizmu v oblastiach, ktoré sú najviac postihnuté funkčne.[18]

### **3.1.5 Klinický obraz**

Demencia sa rozvíja nenápadne, postupne. Zo začiatku sa prejavuje ako porucha poznávacích funkcií. Medzi prvé príznaky patria krátkodobé poruchy pamäte. Pomerne skoro sa objavujú v priebehu rozvoja ochorenia poruchy orientácie v priestore a čase. S postupným prehlbovaním demencie začnú pacienti blúdiť najprv v miestach vzdialenejších od svojho bydliska, neskôr aj blízko neho a v ťažkých štádiách majú problém s orientáciou aj vo vlastnom byte. Časté je zníženie logického uvažovania a súdnosti. V ťažkých štádiách sú pacienti kompletne dezorientovaní, pretože si nič nové nedokážu zapamätať. V priebehu vývoja AD dochádza k zabúdaniu mien, pojmov, k zníženiu slovnej zásoby. Spomaľuje sa myslenie a znižuje sa intelekt.[19]

### **3.1.6 Štádiá choroby**

V ľahkom štádiu prevládajú poruchy kognitívnych funkcií, pociťované nielen subjektívne, ale merateľné objektívnymi psychologickými testovými metódami. Sú narušené aktivity denného života, najmä tie pri ktorých je dôležité udržiavať pozornosť. V strednom štádiu dochádza k prehlbovaniu úbytku kognitívnych funkcií, pribúdajú poruchy reči. Znižuje sa schopnosť tzv. inštrumentálnych výkonov ako napríklad obsluha domácich prístrojov. Často sa objavujú poruchy správania. V ťažkom štádiu ochorenia pacienti väčšinou nespoznávajú najbližších príbuzných ani okolie, sú časovo a priestorovo dezorientovaní. Stávajú sa plne závislými na starostlivosť okolia.[20]

Od objavenia prvých príznakov ochorenia pacienti prežívajú priemerne ďalších 7 až 10 rokov, avšak vďaka liečbe a dobrej starostlivosti sa môže toto obdobie ešte predĺžiť o niekoľko rokov. Najčastejšou príčinou smrti sú pľúcne ochorenia a úrazy.[20]

### **3.1.7 Neuropatologické zmeny**

Mozog u pacientov s AD sa vyznačuje atrofiou. Jeho vzhľad je v počiatočných fázach primeraný. Atrofia postihuje predovšetkým frontálny, temporálny a parietálny lalok. Zmeny sú v rôznej miere v kôre celého mozgu. Atrofický mozog môže vážiť aj menej ako 900 gramov. Strata parenchýmu vyvoláva rozšírenie mozgových komôr.[21]

Prítomnosť senilných plakov a neurofibrilárnych kľbká, ktoré vedú k strate neurónov, sú hlavné znaky neuropatologických zmien. Senilné plakky sú extracelulárne lézie a ich hlavnou zložkou je bielkovina A $\beta$ . Neurofibrilárne kľbká sú intracelulárne lézie, ktoré sú zložené z hyperfosforylovaného  $\tau$ -proteínu.[22]

#### **3.1.7.1 Senilné plakky**

V mozgovom tkanive dochádza v priestoroch mimo nervovej bunky k ukladaniu chorobne vzniknutej bielkoviny, ktorá sa nazýva A $\beta$ . Tvorí kryštáliky okolo ktorých dochádza k ďalším neurodegeneratívnym dejom. Vznikajú tak útvary, ktoré sa nazývajú senilné plakky. Čím viac ich je v určitej oblasti mozgovej kôry, tým viac je táto mozgová oblasť funkčne poškodená.[19]

A $\beta$  vzniká z bielkoviny, ktorá sa nazýva amyloidný prekurzorový proteín (APP). APP je za normálnych podmienok prítomný v mozgových bunkách a je pre organizmus nevyhnutný. Za normálnych okolností je štiepený enzýmom, nazývaným  $\alpha$ -sekretáza na krátke rozpustné fragmenty, ktoré majú svoj fyziologický význam. Pravdepodobne sa podieľajú na plasticite nervových buniek a chránia ich pred poškodením. Za patologických podmienok je následne APP štiepený  $\beta$ - a  $\gamma$ -sekretázami, ktoré vytvárajú podstatne dlhšie fragmenty. Tieto fragmenty neplnia svoje fyziologické funkcie, nie sú rozpustné, zrážajú sa, polymerujú a tak vzniká A $\beta$ . [19]

#### **3.1.7.2 Neurofibrilárne kľbká**

$\tau$ -proteín je spájaný s mikrotubulami, kde je jeho fyziologickou funkciou väzba na mikrotubuly a ich stabilizácia. U AD  $\tau$ -proteín podlieha hyperfosforylácií, agregácií, čo vedie k vzniku neurofibrilárnych kľbká.[23] Abnormálna hyperfosforylácia vedie nielen k strate funkcie  $\tau$ -proteínu, ale tiež spôsobuje narušenie a destabilizáciu mikrotubul. Je to pravdepodobne spôsobené výlučne jeho hyperfosforyláciou, pretože defosforylácia ho mení na funkčný stav.

Hyperfosforylovaný  $\tau$ -proteín sa hromadí do neurofibrilárnych vlákien a neuróny sa postupne degenerujú. Hyperfosforylácia  $\tau$ -proteínu vyplýva jednak z nerovnováhy medzi aktivitami  $\tau$ -kináz a  $\tau$ -fosfatáz, ako aj zo zmien v konformácii  $\tau$ -proteínu, ktoré ovplyvňujú jeho interakciu s týmito enzýmami.[24]

### **3.1.8 Cholinergný systém v AD**

U AD je porušený acetylcholinergný systém, ktorý je dôležitý pre mechanizmy pamäte. Je podstatne znížená tvorba a uvoľnenie acetylcholínu (ACh) z presynaptických zakončení a znížená hladina cholínacetyltransferázy (ChAT), enzýmu, ktorý syntetizuje ACh a zároveň je znížený vstup prekursoru cholínu do neurónov a aj využiteľnosť druhého prekursoru acetylkoenzýmu A. Súčasne je znížený i počet nikotínových receptorov, zatiaľ čo počet muskarínových receptorov zostáva viacmenej nezmenený.[25]

Molekuly ACh sú v synaptickej štrbine odbúravané enzýmami cholinesterázami. Za normálnych okolností je to acetylcholinesteráza (AChE). Ľudská AChE sa v mozgu vyskytuje v dvoch formách a to majoritná forma G4 a minoritná forma G1. Pri AD klesá počet molekúl G4 a stúpa počet G1. V AD sa uplatňuje aj butyrylcholinesteráza (BChE), ktorá je v mozgu zdravých jedincov prítomná v malom množstve. BChE je novotvorená v aktivovaných gliových elementoch, ktoré sú súčasťou lemu senilných plakov. U AD sa významne podieľa na odbúraní ACh. Kým aktivita AChE u pacientov s AD klesá, aktivita BChE sa zvyšuje. Pri hydrolýze ACh môže BChE nahradiť AChE.[18,26]

### **3.1.9 Farmakoterapia Alzheimerovej choroby**

V súčasnej dobe patrí AD medzi nevy liečiteľné ochorenia. Včasnou terapiou je však možné spomaliť jej priebeh a udržať pacientov v ľahších štádiách ochorenia. Cieľom je zmierňovať príznaky a oddialiť ťažšie fázy ochorenia. V liečbe kombinujeme farmakologické a nefarmakologické postupy.[27]

Základom nefarmakologickej liečby je správny psychologický prístup k pacientovi. Nefarmakologická liečba zahŕňa rôzne rehabilitačné programy, vrátane počítačových, ktoré sa zameriavajú na tréning kognitívnych a nekognitívnych funkcií pacientov. Snahou je udržať

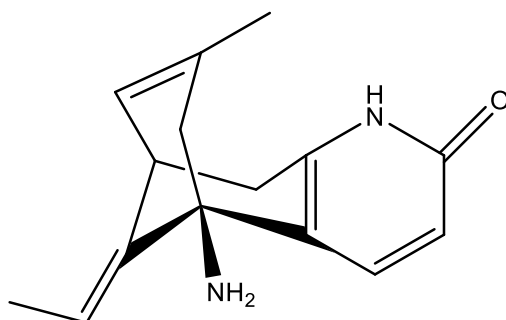
pacienta, čo najdlhšie zapojeného do chodu domácnosti a sociálnych aktivít. Dôležitá je reedukácia pamäti neustálou aktivizáciou, stimuláciou a konfrontáciou s realitou. Nevyhnutnou súčasťou je aj spolupráca s opatrovateľmi a alzheimerovskými spoločnosťami.[20]

Vo farmakoterapii sú používané dve skupiny liečiv, ktoré sú založené na dôkazoch.[27] Pre ľahké a stredné formy AD sú indikované inhibítory acetylcholinesterázy (iAChE), pre ťažké štádiá sú používaní antagonisti *N*-metyl-D-aspartátových receptorov (NMDA-receptorov).[26]

### **3.1.9.1 Inhibítory cholinesteráz**

Sú to doteraz najúčinnnejšie liečiva pre terapiu ľahkých až stredne ťažkých štádií. Musia dobre prechádzať hematoencefalickou bariérou. Väčšina z nich sú iAChE, niektoré však inhibujú aj BChE. Podstatou pôsobenia je zablokovanie enzýmov odbúravajúcich ACh a tým predĺženie väzby ACh na jeho receptoch a zvýšenie acetylcholinergnej transmisie. IChE sa zrejme podieľajú na tvorbe a toxicite A $\beta$ . Spomaľujú priebeh ochorenia a oddiaľujú jeho prechod do ťažších štádií.[25] IChE majú aj ďalšie neuroprotektívne účinky, ktoré sú uskutočňované inak ako mechanizmom inhibície cholinesteráz. Je to ovplyvňovanie metabolizmu APP, neuroprotektia sprostredkovaná agonizujúcimi nikotínovými acetylcholinovými receptormi moduláciou muskarínových receptorov a inhibícia NMDA-receptorov.[28] V súčasnosti sa používajú 3 látky: donepezil, rivastigmín a galantamín.[29]

Potenciálny zdroj iAChE predstavujú aj sekundárne metabolity rastlín, ktoré majú schopnosť inhibovať AChE.[4] Najväčšiu časť rastlinných metabolitov s potenciálnou inhibičnou aktivitou voči AChE a BChE tvoria alkaloidy.[5] Ako stabilný, reverzibilný inhibítor AChE pôsobí aj huperzín A. Je to alkaloid získaný z čínskeho plavúňa *Huperzia serrata* Thunb.[29] Používa sa na liečbu AD v Číne a v USA je dostupný ako nutraceutikum. Okrem inhibície AChE má aj ďalšie účinky. Najdôležitejší z nich je ochranný účinok neurónov proti oxidatívne poškodeniu a mitochondriálnej dysfunkcii, ktoré sú indukované A $\beta$ . [30] Pôsobí aj ako antagonista NMDA-receptorov. Vďaka širokej škále priaznivých účinkov ovplyvňujúcich nervovú sústavu sa stáva vhodným kandidátom pre liečbu AD. Huperzín A je 2 – 8. krát schopnejší zvýšiť hladinu ACh v mozgu v porovnaní s ostatnými používanými iAChE.[31]



Obr. 1 Vzorec huperzínu A

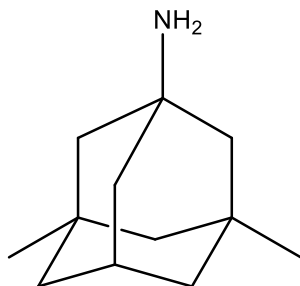
Indolové alkaloidy patria k hlavným typom s významným inhibičným účinkom na cholinesterázy a sú tak sľubnými kandidátmi ako iChE v klinickej praxi. Väčšina alkaloidov s inhibičnou aktivitou bola izolovaná z čeľadi Apocynaceae, Buxaceae, Amaryllidaceae, Lycopodiaceae, Papaveraceae.[5] Medzi indolové alkaloidy z čeľade Apocynaceae, ktoré inhibujú AChE patria serpentín, uleín, koronaridín, voakangín, 19,20-dihydroervahanín A, 19,20-dihydrotabernamín, rauvolfin C a 3-metyl-10,11-dimetoxi-6-metoxycarbonyl- $\beta$ -karbolín.[32,33]

### 3.1.9.2 Antagonisti NMDA-receptorov

S postupnou progresiou AD dochádza k postihnutiu excitačných aminokyselín, čiže glutamátergneho systému. Tento systém je významný pre mechanizmy učenia a pamäte.[25] NMDA-receptory sú spájané s otvorením iontových kanálov pro vápenaté ionty. U AD dochádza k excitotoxicite, čo znamená nadmerné uvoľňovanie excitačných aminokyselín – glutamátu a aspartátu, ktoré následne vedú k hyperexcitácii receptorov typu NMDA. Tým pádom dochádza k nadmernému vstupu kalciových iontov do neurónov av dôsledku toho nastáva apoptóza neurónov.[17]

Memantín je zatiaľ jediná používaná látka tejto skupiny. Je určený predovšetkým k liečbe stredne ťažkých až ťažkých štádií AD.[25] Výrazne znižuje excitotoxické pôsobenie na neuróny.

Ďalší pozitívny efekt memantínu je inhibícia glykogénsyntázy kinázy 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), ktorá spúšťa degeneráciu neuronálneho  $\tau$ -proteinu. Výsledky štúdií hovoria, že kombinovaná liečba memantínu s donepezilom je najužitočnejšou liečbou AD.[17]



Obr. 2 Vzorec memantínu

### 3.1.9.3 Doplnková liečba

Existuje viacero ďalších farmakoterapeutických postupov, ktoré už nie sú tak jednoznačne účinné ako iAChE a memantín. Ich použitie nie je založené na dôkazoch („Evidence-based-Medicine“) a preto sa používajú najmä ako doplnky. V týchto prípadoch nejde o dostatočne účinnú liečbu.[34]

#### Ginkgo biloba L.

Štandardizovaný extrakt z *Ginkgo biloba* EGb761 je zmes mnohých aktívnych látok so synergickým výsledným efektom. Hlavnými nositeľmi farmakologických účinkov sú flavónové glykozidy, ktorých obsah je 24 % a terpenové laktóny s obsahom 6 %. Najdôležitejšie sú neuroprotektívne účinky a pozitívne účinky na kognitívne funkcie. Ďalšie účinky EGb761: antioxidačné, protizápalové, antiapoptotické. Ochranne pôsobia na mitochondrie – znižuje sa tvorba voľných radikálov, ovplyvňujú bunkový energetický metabolizmus a nepriamo znižujú tvorbu A $\beta$ . [35]

#### Nootropiká

Nootropiká sú látky, ktoré zlepšujú mozgový metabolizmus. U demencií je zistený defekt oxidatívneho mozgového metabolizmu. Klinické štúdie nepreukázali výrazné efekty v ovplyvnení priebehu AD. Medzi nootropiká patrí piracetam, ktorý okrem pozitívneho

metabolického pôsobenia zlepšuje reologické vlastnosti krvi a pyritinol, ktorý má aj slabý protizápalový účinok a mierny efekt na vychytávanie voľných radikálov.[25]

#### Voľné kyslíkové radikály

Za normálnych okolností je vznik a likvidácia voľných radikálov v rovnováhe. U AD je ich vznik podstatne vyšší. Nadbytočne radikály sa naviažu na enzýmy, poškodzujú ich, dochádza k degenerácii neurónov, ktoré podliehajú apoptóze a zanikajú. K ich vychytávaniu sa používajú tzv. vychytávače voľných radikálov. Patria sem vitamín E, vitamín C, pyritinol, retinol a  $\beta$ -karotén.[18]

### **3.1.10 Potencionálne terapeutické ciele**

V súčasnej dobe je v snaha o rozširovanie indikácií zavedených liečiv, vrátane liečby skorých štádií AD. Sú testované nové liekové formy. Vo výskume je vo fáze klinického skúšania veľké množstvo nových preparátov. Zo základných smerov v nových postupoch liečby je na prvom mieste ovplyvnenie amyloidovej kaskády, potom je to aktívna a pasívna imunoterapia a ďalšie nové odlišné smery liečby.[36]

#### **3.1.10.1 Anti-amyloidná terapia**

Za primárny defekt u AD je považované patologické ukladanie A $\beta$  v mozgu. A $\beta$  je tvorený chybným štiepením APP, enzýmami  $\beta$ - a  $\gamma$ -sekretázou. Výskumom v roku 1999 sa preukázala možnosť zabránenia vzniku senilných plakov tvorených A $\beta$  vakcináciou. Bolo dokázané, že vakcína proti A $\beta$  zabraňuje vzniku senilných plakov. Testovanie tejto látky však bolo zastavené kvôli výskytu závažných nežiadúcich účinkov. U 6 % pacientov sa rozvinula postvákcinálna encefalitída. Nádejou bola redukcia APP, ktorého chybným štiepením vzniká A $\beta$ , avšak u látok fenserinu a deferoxaminu sa nepreukázal žiaden klinický efekt.[36].

Ďalšou možnosťou ovplyvnenia kaskády, ktorá vedie k akumulácii A $\beta$  je inhibovanie enzýmov zodpovedných za jeho vznik.[37] Inhibítory  $\beta$ -sekretázy sú v súčasnosti klinicky testované a skúmané, doterajšie výsledky ukazujú dobrú toleranciu. Inhibícia  $\beta$ -sekretázy vyzerá byť nádejným prístupom liečby AD. Inhibítory  $\gamma$ -sekretázy spôsobujú závažné nežiadúce účinky, vyplývajúce z toho, že dochádza k inhibícii transmembránového receptora NOTCH. Táto

inhibícia môže zapríčiniť veľmi vážne zmeny v imunite. Modulátory  $\gamma$ -sekretázy ovplyvňujú len časť  $\gamma$ -sekretázy, ktorá zodpovedá za štiepenie APP. V tomto prípade bol skúšaný tarenfluril. Je to R-enantiomer antireumatika flurbiprofenu. Aj napriek dobrej tolerancii nebolo zistené výrazné zlepšenie prejavov AD. Látka tramiprosat blokujúca oligomeráciu a polymerizáciu A $\beta$  je dobre znášanou látkou, ale doterajšie výsledky klinických štúdií nepriniesli za dlhšie časové obdobie výraznejšie zlepšenie kognitívnych funkcií.[38]

#### **3.1.10.2 Imunoterapia**

V dnešnej dobe je vo fáze klinického výskumu najmenej 13 látok pre aktívnu a pasívnu imunizáciu. Pasívna imunoterapia je založená na princípe zachovania umelých hladín protilátok IgG proti A $\beta$ . Látky sa podávajú v infúziách a predpokladá sa u nich účinnosť mechanizmom zabránenia akumulácie A $\beta$ . V klinických testoch sa skúmajú látky ako gantenerumab a solanezumab. Ďalšou stratégiou pasívnej imunizácie sú injekcie intravenózneho imunoglobulínu (IVIG). IVIG je zmes prirodzených ľudských imunoglobulínov vrátane protilátok proti A $\beta$ . IVIG bráni tvorbe A $\beta$ , napomáhajú jeho vylučovaniu z mozgu a chráni neurón pred jeho toxicitou. IVIG nerozpoznávajú zloženie A $\beta$ , ale protilátky identifikujú jeho zlé zloženie alebo tvar a tak nechávajú dobré molekuly nedotknuté.[36]

#### **3.1.10.3 Plazmaferéza**

Použitie tejto metódy predpokladá rovnováhu medzi koncentráciou A $\beta$  v krvi a v likvore. Plazmaferézou znižujeme sérovu koncentráciu A $\beta$  a tým nepriamo koncentráciu tejto látky v likvore. Dostupné výsledky ukazujú zlepšenie kognitívnych funkcií. Rozšíreniu tejto metódy do praxe bráni najmä procedurálna náročnosť liečby.[37]

#### **3.1.10.4 Agonisti jadrového transkripčného faktoru PPAR $\gamma$**

Receptor aktivovaný proliferátormi peroxizómov (PPAR) je jadrový receptor, ktorý pôsobí protizápalovo, znižuje toxicitu A $\beta$  v mozgu a reguluje citlivosť voči inzulínu. Zosilňuje reguláciu antiapoptotického faktoru Bcl-2. Preto sú v terapii AD skúšané jeho agonisti ako napríklad glitazonové antidiabetikum rosiglitazon.[36]



### **3.1.10.5 Látky ovplyvňujúce mitochondriálne funkcie**

Mitochondrie sú u AD výrazne postihnuté. Dochádza k zníženiu energetického výdaja, k veľkému uvoľneniu kyslíkových radikálov a následne k oxidatívne stresu. Skúmané sú viaceré látky, hlavne antioxidanty napríklad kyselina lipoová, idebenon, koenzým Q10. Veľmi nádejnou látkou je latrepiridin, aj keď posledné štúdie zatiaľ nepriniesli očakávaný výsledok.[36]

### **3.1.10.6 Vakcíny proti patologicky zmenenému $\tau$ -proteínu**

Sú vyvíjané napríklad monoklonálne protilátky s chaperonovou aktivitou. Chaperony sú proteíny, ktoré skladajú iné proteíny v tele do ich správneho priestorového usporiadania. Tieto vakcíny do budúcnosti predstavujú sľubný smer terapie.[36]

### **3.1.10.7 Inhibítory prolyloligopeptidázy**

Prolyloligopeptidáza (POP) predstavuje potencionálny terapeutický zásah v AD. POP je enzým, ktorý štiepi peptidy s relatívne malou molekulovou hmotnosťou na karboxylovej skupine prolínového zvyšku. Najvyššiu aktivitu pôsobenia má v mozgu, najmä v kôre. Zistilo sa, že hladiny POP sú významne vyššie u pacientov s AD. Inhibítory POP môžu zlepšovať pamäť blokovaním metabolizmu endogénnych neuropeptidov, ktoré zvyšujú kognitívne vlastnosti s pozitívnym účinkom na cholinergnú aktivitu. POP sa podieľa na spracovaní C-koncového časti APP, takže inhibítory POP by mohli znížovať ukladanie A $\beta$ . [39]

### **3.1.10.8 PBT2**

PBT2, derivát 8-hydroxychinolínu, je zlúčeninou, ktorá narúša interakciu medzi iónmi kovu a A $\beta$  v mozgu. PBT2 bráni agregácii A $\beta$  a zároveň obnovuje homeostázu iónov medi a zinku v bunkách. Podľa vedcov zvyšovanie hladiny bioaktívneho kovu v starom mozgu urýchľuje tvorbu amyloidných plakov. PBT2 translokuje ióny medi a zinku do bunky, čím sa znižuje ich extracelulárna hladina a tým aj agregácia A $\beta$  sprostredkovaná iónmi kovu.[40]

### **3.1.10.9 Ďalšie potencionálne terapeutické ciele**

K ďalším skúmaným látkam a možnostiam ovplyvnenia zápalových a degeneratívnych zmien u AD patria antagonisti fosfodiesteráz, agonisti nikotínových receptorov, látky modulujúce

zápalové reakcie napríklad etanercept, inhibítory enzýmu GSK-3 $\beta$ , ktorý spúšťa degeneráciu intraneuronálneho  $\tau$ -proteínu alebo stimulácia aktivity  $\alpha$ -sekretázy, enzýmu ktorý štiepi APP na krátke fragmenty. Odlišným smerom vývoja výskumu AD je zisťovanie odozvy na liečbu v závislosti na fenotype a genotype ApoE. Tento farmakogenomický prístup k liečbe sa zdá byť veľmi prínosným v lepšom využití súčasne dostupných liečiv.[36,38]

### 3.2 *Vinca minor* L.

#### 3.2.1 Taxonómia

Tabuľka 1 Taxonomické zaradenie [7]

<b>Ríša:</b>	Plantae
<b>Oddelenie:</b>	Magnoliophyta
<b>Rad:</b>	Gentiales
<b>Čeľad':</b>	Apocynaceae
<b>Rod:</b>	<i>Vinca</i>
<b>Druh :</b>	<i>Vinca minor</i> L.

#### 3.2.2 Čeľad' Apocynaceae

☞ \* K(5) [C(5-4) A5] G(2) [7]

V tejto čeľadi existuje 160 až 200 rodov, čo je asi 2 000 rôznych druhov rastlín. Do tejto čeľade patria vytrvalé byliny, polokry, malé kry, v trópoch viacmenej drevené liány alebo stromy. Prevažuje výskyt v trópoch a subtrópoch. V pletivách sa vyskytujú nečlánkované mliečnice a bikolaterálne cievné zväzky. Plod tvorí mechúrik, tobolka, bobuľa alebo peckovica. Z obsahových látok sa v tejto čeľadi vyskytujú kardioaktívne glykozidy, indolové alkaloidy, sekoiridoidné a iridoidné monoterpény a taktiež kaučuky, ktoré sú rozptýlené v latexe.[7] Listy sú obvykle vstříčné alebo v praslenoch, jednoduché, celokrajné, často kožovité, stálozelené.

Nachádzajú sa v nich trichómové útvary, ktoré vylučujú živicu. Kvety majú vo vrcholičnatých kvetenstvách, sú 4- alebo 5-početné, obojpohlavné, pravidelné.[41]

### 3.2.3 Rod *Vinca*

Rod *Vinca* zahŕňa druhy rastlín mierneho pásma, ktoré sú pôvodné v Európe, v severozápadnej a juhozápadnej Afrike a v strednej Ázii. Patrí sem 7 druhov a to *Vinca difformis* Pouret, *Vinca erecta* Regel & Schamlh, *Vinca pubescens* d'Urv, *Vinca herbacea* Waldst. & Kit, *Vinca soneri* Koyuncu, *Vinca ispartensis* Koyuncu & Eksi, *Vinca major* L a *Vinca minor* L. V Českej republike sa vyskytujú posledné dva spomínané druhy. Na Slovensku sa vyskytuje aj *Vinca herbacea*, rastie v najteplejších oblastiach, v nížinách a pahorkatinách, je to chránený druh.[42,43]

### 3.2.4 Popis *Vinca minor* L.

*Vinca minor* L. je u nás voľne rastúci zástupca z čeľade Apocynaceae. U nás je táto rastlina považovaná za jedovatú. Je to plazivá, vytrvalá bylina. Listy sú kožovité, vytrvalo protistojné, pri bázi drevnatejúce.[7] Majú typickú tmavozelenú farbu, na rube sú svetlejšie. Sú krátko stopkaté, neopadavé, krátko kopijovité až eliptické. Kvety má obojpohlavné, pravidelné a 5-početné.[44] Majú modrú farbu. Plodom sú mechúriky.[7] Dorastá do výšky 10 až 20 cm, rozrastá sa plazivým podzemkom. Rozmnožuje sa vegetatívne odzemkom. Kvitne od marca do júna. Vyskytuje sa najmä v listnatých lesoch, na skalách, v krovinách. Na čerstvo vlhkých pôdach, obsahujúcich živiny, vytvára kompaktné porasty.[44] Splaňuje v okolí sídlisk, parkov, kostolov a cintorínov. V Českej republike sa vyskytuje do nadmorskej výšky približne 800 metrov, často sa pestuje na záhradách.[45] Táto rastlina je pôvodom zo severného Španielska, západného Francúzska, strednej a južnej Európy a Kaukazu.[46]



Obr. 3 *Vinca minor* L. – kvet[47]

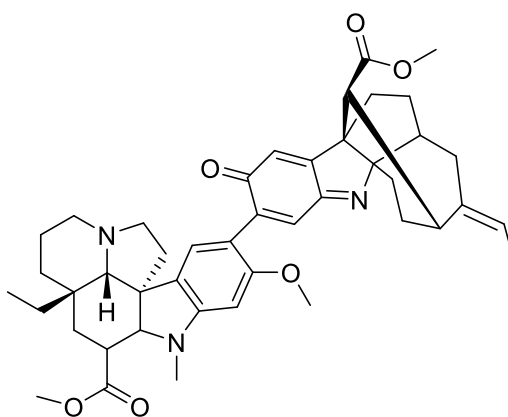
### 3.2.5 Obsahové látky

Hlavnou skupinou obsahových látok v tejto rastline sú indolové alkaloidy, ktorých množstvo sa pohybuje v rozmedzí od 0,3 – 1 %.[48] Dominantným alkaloidom tejto rastliny je vinkamín. Ďalej sa tu nachádzajú alkaloidy ako vinkaminorín, vinkaminoreín, minovín, minovincín, vinkarubín.[49] Okrem nich sa tu vyskytujú aj ďalšie látky ako saponíny, pektín, horčina vincín, deriváty kyseliny flavonovej a ursolovej, flavonoidné glykozidy a triesloviny.[45,50]

### 3.2.6 *Vinca* alkaloidy

Z *Vinca minor* L., patriacej do čelade Apocynaceae bolo izolovaných viac ako 50 indolových alkaloidov.[49] *Vinca* alkaloidy patria do skupiny indolových alkaloidov.[50] Indolové alkaloidy zahŕňajú viac ako 3000 zástupcov a sú veľmi významnou skupinou alkaloidov v rastlinách. Vyskytujú sa najmä v čeľadiach Loganiaceae, Apocynaceae a Rubiaceae.[51] *Vinca* alkaloidy boli objavené v 50. rokoch 20. storočia kanadskými vedcami Robertom Noblom a Charlesom Beerom. Pôvodne boli izolované z rastliny *Catharantus roseus* Don.G.[52] *Vinca* alkaloidy blokujú mitózu zastavením metafázy. Majú protinádorovú aktivitu a tá je založená na ich vysokej väzbovej afinite k intracelulárnemu tubulínu, čo je proteínová podjednotka mikrotubúl. Tvorba komplexov medzi *Vinca* alkaloidmi a tubulínom zabraňuje polymerizácii podjednotiek tubulínu na mikrotubuly, čo vedie k depolymerizácii mikrotubulov a inhibícii zostavenia mikrotubulov.[53] Nastane ich destabilizácia, mitotický blok a apoptóza. *Vinca* alkaloidy majú účinok na nezhubné aj malígne bunky aj v nemitotickom bunkovom cykle, pretože mikrotubuly sa podieľajú na viacerých nemitotických funkciách.[51,52]

*Vinca* alkaloidy, izolované z *Vinca minor* L. rozdeľujeme podľa štruktúry do skupín na  $\alpha$ -metyléndindolinové, indolínové indolové, oxindolové a 3*H*-indolové. Každá zo skupiny alkaloidov má svoje charakteristické reakcie, spektrálne vlastnosti a množstvo funkčných skupín daných pre jednotlivú skupinu. V dôsledku toho je identifikácia alkaloidov, určenie ich štruktúry a príslušnosti k jednotlivým skupinám ľahko uskutočniteľné pomocou použitia chemických a fyzikálnych metód.[54] Vinkarubín je jediný izolovaný alkaloid s bisindolovou štruktúrou (obr. 4).[49]

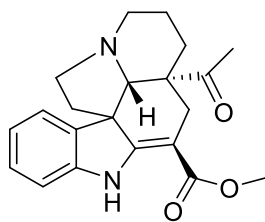


Obr. 4 Vzorec vinkarubínu

Okrem alkaloidov, ktoré sú vymenované v jednotlivých skupinách, boli z *Vinca minor* L. izolované ďalšie alkaloidy a to: *O*-acetylvinosín, 16-epipleiokarpamín, pleiokarpamín, 19-dihydrovinosín, (–)-1-norvinkorín, ervinidinín, 5-oxominovincín, vallesiachotamín, izovallesiachotamín, 10-hydroxykaofolín a 9-metoxylvinkamín.[55–57]

#### $\alpha$ -METYLÉNDINDOLINOVÉ ALKALOIDY

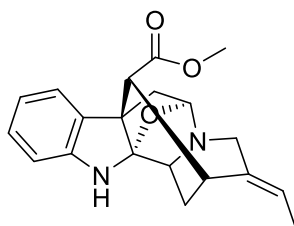
Alkaloidy tohto typu majú v  $\alpha$ -polohe k atómu dusíka indolínu väzbu konjugovanú s karbonylovou skupinou. Všetky uvedené alkaloidy sú deriváty akuammicínu a obsahujú heterocyklický skelet, ktorý obsahuje 18 atómov uhlíka. Ďalšia skupina  $\alpha$ -metyléndindolínových alkaloidov obsahuje heterocyklický skelet vinkadiformínu (19 uhlíkových atómov). Medzi alkaloidy tejto skupiny izolované z *Vinca minor* L. patria: (–)-vinkadiformín, metoxylvinkadiformín, minovincín, minovincín, metoxyminovincín, minovín, *N*-metylvinkadiformín, metoxyminovincín, 5-oxominovincín.[54,58]



Obr. 5 Vzorec minovincínu

## INDOLÍNNOVÉ ALKALOIDY

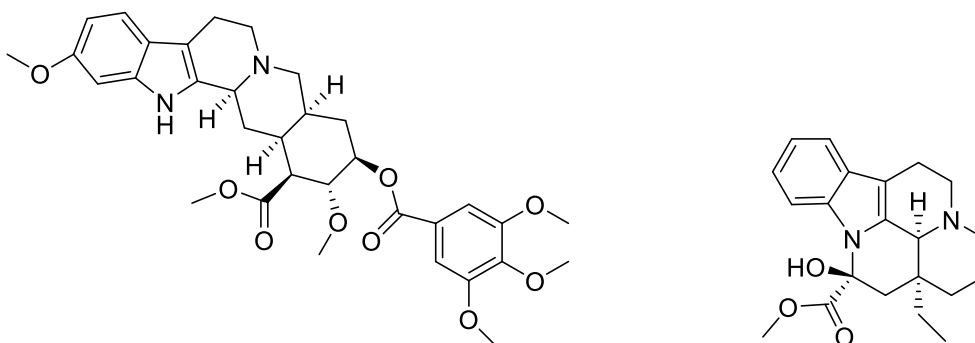
Alkaloidom v tejto skupine chýba konjugovaná dvojité väzba na C<sub>2</sub>-C<sub>16</sub>. Charakteristická je pre ne prítomnosť dvoch absorpčných maxim v UV spektrách. Zaradzujeme sem *N*-metylaspidospermidín, pikrinín, vinkoridín, vincovín.[54]



Obr. 6 Vzorec pikrinínu

## INDOLOVÉ ALKALOIDY

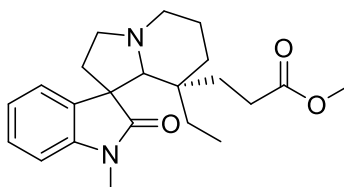
Alkaloidy vinkamín a quebrachamín sú základnými predstaviteľmi tejto skupiny. Vinkamín bol jedným z prvých alkaloidov izolovaných v rastlinách rodu *Vinca*. Indolové alkaloidy sú najrozmanitejšou skupinou, čo sa týka štruktúry a obsahujú heterocyklické jadra quebrachamínu, vinkamínu, heteroyohimbanu, tombozin-pleiokarpamínu a yohimbanu. Patria sem: quebrachamín, vinkamín, reserpín, 10-metoxyvellosimín, *N*-metylquebrachamín, vinkaminoreín, vinkaminorín, vinkaminoridín, epivinkamín, vincín, eburnamín, (–)-eburnamenín, eburnamenín, vincinín, (+)-izoeburnamín, 11-metoxyburnamonín, 11,12-dimetyloxyeburnamonín, vinkaminín, hydroxyvinkamín, vinkadín, vinkorín a vinoxín, ktorý je neobvyklý alkaloid a nemá štruktúrný analóg.[54,58]



Obr. 7 Vzorec rezerpínu a vzorec vinkamínu

### OXINDOLOVÉ ALKALOIDY

Obsahujú heterocyklický systém spiro[pyrolidín-7,7'-oxindol] a štruktúrne sú blízke alkaloidom z heteroyohimbanovej skupiny. Oxindolové bázy sú analógy karapanaubínu s výnimkou vinkatínu a líšia sa povahou a polohou substituentov na C<sub>3</sub>, C<sub>15</sub>, C<sub>19</sub> a C<sub>20</sub>. Mnohé transformácie a chemické vlastnosti súvisia s vysokou reaktivitou substituentov na C7. Vinkatín je jediný oxindolový alkaloid izolovaný z *Vinca minor* L., obsahujúci heterocyklický skelet aspidospermidínu.[54]



Obr. 8 Vzorec vinkatínu

### 3H-INDOLOVÉ ALKALOIDY

Zástupcov 3H-indolových alkaloidov je len málo a sú považované za desmotropické formy indolových alkaloidov, v ktorých substituenty na C7 majú zvýšenú reaktivitu. Patria sem alkaloidy obsahujúce jadra aspidospermidínu, ajmalínu a pikrinínu a to konkrétne dehydroaspidospermid, 10-metoxideacetylakummilín, vinorín, deacetylakuammilín a vinkamidín.[54]



Obr. 9 Vzorec vinorínu a vzorec vinkamidínu

### 3.2.7 Biologická aktivita obsahových látok *Vinca minor* L.

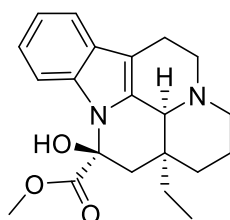
Tabuľka 2 Biologická aktivita alkaloidov *Vinca minor* L.

akuammicín	stimulačný účinok na absorpciu glukózy v adipocytoch 3T3-L1 [59]
	agonista $\kappa$ -opioidných receptorov u morčáťa [60]
pikrinín	analgetický a protizápalový účinok in vivo [61]
	inhibícia COX-1, COX-2 a 5-LOX in vitro [61]
	antitusický a antiastmatický účinok in vivo [62]
reserpín	antihypertenzívny účinok [63]
vinkadiformín	inhibičný účinok na proliferáciu buniek P388 [64]
vinkaminorín	inhibičný účinok na proliferáciu buniek P388 [64]
vinkaminoreín	inhibičný účinok na proliferáciu buniek P388 [64]
vinkamidín (striktamin)	inhibičná aktivita proti adenoviru a herpes simplex viru [65]
vinkarubín	významný cytotoxický účinok proti bunkám leukémie P388 [49]
vinorín	protizápalové, analgetické, protinádorové účinky [66]
	pozitívny účinok na obnovenie motorických funkcií, citlivosti a urýchlenú regeneráciu pri poranení sedieho nervu u potkana v dávke (7.5, 15 a 30 mg/kg) pri injekčnom podaní [66]

Vinkamín



Vinkamín je periférny vazodilatátor, ktorý zvyšuje prietok krvi do mozgu. Je prospešný pre procesy ochrany buniek nervového systému. Používa sa ako adjuvas v prípade cerebrovaskulárnej nedostatočnosti, pri otrase mozgu alebo po mŕtvici. A je to tiež nootropikum. Má priaznivý účinok pri mnohých mozgových poruchách starších pacientov ako sú poruchy pamäte, závraty, prechodné ischemické deficity a bolesti hlavy. Vinkamín má ochranný účinok proti keratitíde vyvolanej lipolysacharidmi (LPS) a oxidačnému stresu na ľudských epiteliálnych bunkách rohovky. Výsledky štúdie ukázali, že vinkamin chránil epitelálne bunky rohovky pred LPS a zmiernil zápal. Vykazoval silnú antioxidačnú aktivitu, znižoval hladiny voľných kyslíkových radikálov. Vinkamín vykazuje pozitívne účinky proti oxidatívne stresu a zápalu vyvolanému lipolysacharidmi a môže byť užitočný pri ochrane rohovkových epitelových buniek pred keratitídou vyvolanou LPS.[50,67,68]

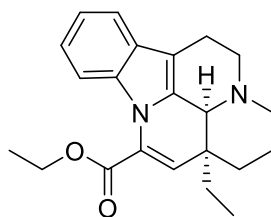


Obr. 10 Vzorec vinkamínu

## Vinpocetín

Vinpocetín je semi-syntetický derivát vinkaminu, alkaloidu izolovaného z *Vinca minor*. [69] Má protizápalové, antioxidačné, vazodilatčné, antiepileptické a neuroprotektívne účinky. U chronických pacientov s cerebrovaskulárnymi problémami zlepšuje zhoršené hemoreologické vlastnosti, endotelovú dysfunkciu, prietok krvi v mozgu a pomáha tým zlepšiť kognitívne funkcie. [70] Vinpocetín, obchodný názov Cavinton, bol pôvodne vyvinutý v Maďarsku okolo roku 1978. Používa sa na prevenciu a liečbu mozgovej príhody, senilnej demencie a porúch pamäti. V súčasnosti je na svete mnoho produktov, obsahujúcich vinpocetín ako doplnok výživy na zlepšenie pamäti a kognitívnych funkcií. [71] Nedávne štúdie objavili, že vinpocetín má aj protizápalové účinky, ďalej antagonizujúci efekt na vaskulárnu remodeláciu vyvolanú poranením, aterosklerózu indukovanú vysokým obsahom tukov. Takisto zmierňuje patologickú remodeláciu srdca a osteoblastickú diferenciáciu buniek

hladkého svalstva ciev a je tak sľubným kandidátom na klinickú liečbu vaskulárnej kalcifikácie.[71,72] Zlepšuje krvný obeh, chráni mozog pred hypoxiou a ischémiou, má antikonvulzívny účinok, zlepšuje reologické vlastnosti krvi a inhibuje agregáciu trombocytov. Neuroprotektívny účinok súvisí s inhibíciou napäťovo riadených  $\text{Na}^+$  kanálov. Inhibuje fosfodiesterázu a tak zvyšuje intracelulárne hladiny GMP vo vaskulárnom svale, čo vedie k zlepšeniu mozgovej cirkulácie a metabolizmu.[73]

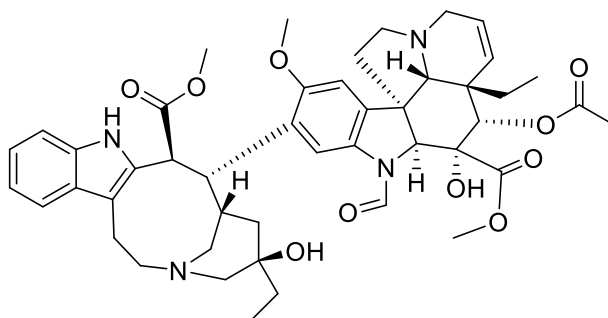


Obr. 11 Vzorec vinpocetínu

### 3.2.8 Využitie ďalších *Vinca* alkaloidov v terapii

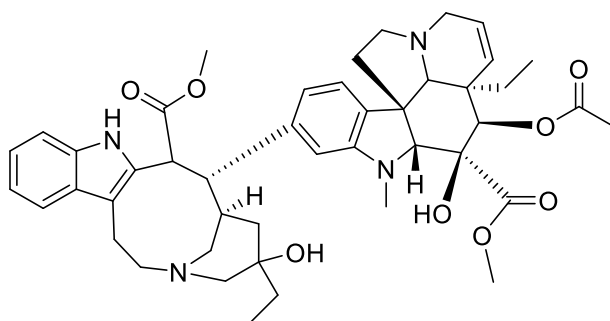
*Vinca* alkaloidy, sú druhou najpoužívanejšou skupinou látok v liečbe nádorov. V terapii sa používajú hlavne vinblastín, vinkristín, vinorelbín a vindesín a najnovšie objavený vinflunín.[52] Vinkristín a vinblastín, izolované z rastliny *Catharanthus roseus* Don.G majú najvyššiu protinádorovú aktivitu.[53]

Vinkristín je používaný na liečbu akútnej leukémie, zvlášť u detí, kde sa vykazuje vysoká miera remisie, ďalej v liečbe neuroblastómu, Wilmovho nádoru, Ďalšou charakteristikou vinkristínu je liečenie nemalígnych hematologických porúch ako je autoimunitná trombocytopénia a hemolytický uremický syndróm.[51,52,74]



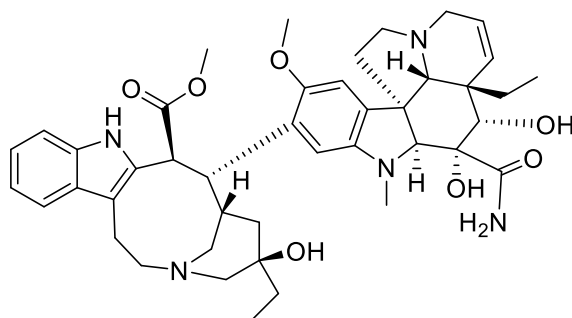
Obr. 12 Vzorec vinkristínu

Vinblastín je mitotický inhibítor, ktorý je používaný na liečbu leukémie, Hodgkinovej a non-hodgkinovej choroby, rakoviny prsníka, Ewingov sarkómu, malobunkového karcinómu pľúc a semenníkov. Obmedzuje nielen rast nádoru, ale aj malígnu angiogézu. Vedľajšie účinky spočívajú v toxicite na biele krvinky, ďalej je prítomná nevoľnosť, zvracanie, dýchavičnosť a horúčka.[75]



Obr. 13 Vzorec vinblastínu

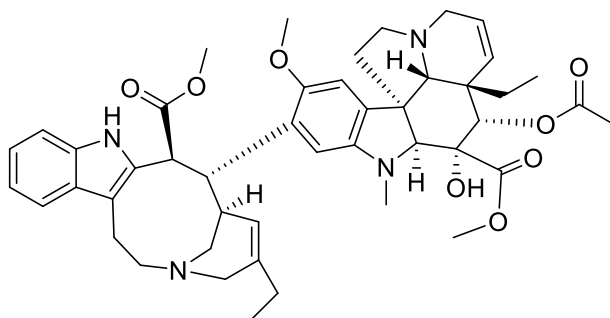
Vindesín je semisyntetický derivát vinblastínu, ktorý bol zavedený na liečbu akútnej lymfoidnej leukémie u detí. Má podobné účinky ako vinblastín. Je používaný pri akútnej lymfocytovej leukémii, chronickej myeloidnej leukémii, malígneho melanómu a metastatických karcinómov obličiek, pažeráka a kolorektálneho karcinómu.[75]



Obr. 14 Vzorec vindesínu

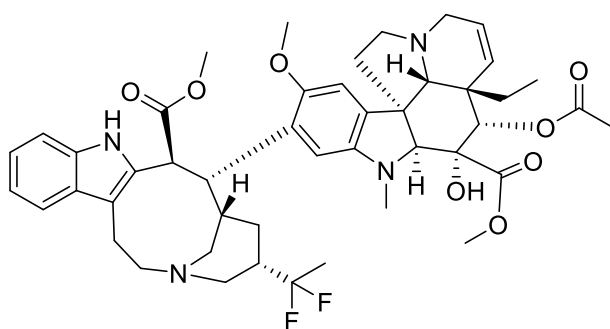
Vinorelbín je semisyntetický alkaloid, ide o derivát vinblastínu. Má významný protinádorový účinok v liečbe pokročilého metastatického karcinómu prsníka, osteosarkómu a v liečbe nemalobunkového karcinómu pľúc, kde sa často podáva v kombinácii s cis-platinou. Vedľajšie

účinky sú krvácanie, anémia, zápcha, hnačka, nevoľnosť, necitlivosť alebo brnenie v rukách a nohách, únav a zápal v mieste vpichu injekcie.[76]



Obr. 15 Vzorec vinorelbínu

Vinflunín je prvý flurovaný inhibítor mikrotubulov syntetizovaný z vinorelbínu. Líši sa od ostatných alkaloidov tým, že sa táto zlúčenina slabo viaže na tubulin, čo znamená lepšiu toleranciu, v dôsledku menšej neurotoxicity. Vinflunín má nielen nádorový cytostatický účinok, ale aj špecifický antiangiogénny účinok. Klinicky je používaný pri liečbe karcinómu prsníka a nemalobunkového karcinómu pľúc.[75]



Obr.16 Vzorec vinflunínu

## 4 EXPERIMENTÁLNÁ ČASŤ

### 4.1 Materiál a chemikálie

#### 4.1.1 Rozpúšťadlá a chemikálie

- acetón p. a. ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ), Penta, Praha
- amoniak 25% p. a. , vodný roztok ( $\text{NH}_3$ ), Penta, Praha
- cyklohexán č. (CHX), Lachner, Neratovice
- diethylamín p. a. ( $\text{Et}_2\text{NH}$ ), Penta, Praha
- dietyléter p. a. ( $\text{Et}_2\text{O}$ ), LachNer
- etanol 95% ( $\text{EtOH}$ ), Lihovar Chrudim, Chrudim
- etylacetát p. a. ( $\text{EtOAc}$ ), Penta, Praha
- chloroform p. a. ( $\text{CHCl}_3$ ), Penta, Praha
- kyselina chlorovodíková ( $\text{HCl}$ ) 35%, Penta
- kyselina trifluoroctová (TFAA), Fluka, Bukurešť
- metanol p. a. ( $\text{MeOH}$ ), Penta, Praha
- toluén č. (To), Penta, Praha
- uhličitan sodný 35% ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), Penta

#### 4.1.2 Pomocné látky

- kremelina C 535 Cedlite, Sigma-Aldrich, Praha
- vata

#### 4.1.3 Detekčné činidlá

- D 1: Dragendorffovo činidlo – používa sa na detekciu alkaloidov.[77]

Roztok A bol pripravený rozpustením 1,7 g dusičnanu bizmutitého zásaditého a 20 g kyseliny vínnej v 80 ml vody.

Roztok B vznikol rozpustením 16 g jodidu draselného v 40 ml vody.

Zásobný roztok vznikol zmiešaním roztoku A a roztoku B v pomere 1:1.

Detekcia: Postrekuje sa roztokom, ktorý je zložený z 10 g kyseliny vínnej, 50 ml vody a z 5 ml zásobného roztoku.

#### 4.1.4 Vytváracie systémy pre tenkovrstvú chromatografiu

S 1: CHX : Et<sub>2</sub>NH : CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH (85 : 10 : 5)

S 2: CHX : CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub> : NH<sub>3</sub> (15 : 10 : 0,05)

S 3: To : CHX : Et<sub>2</sub>NH (40 : 50 : 10)

S 4: EtOAc : MeOH : TFAA (40 : 10 : 0,1)

#### 4.1.5 Chromatografické absorbenty

- Silikagél (SiO<sub>2</sub>), 0,063 – 0,2 mm, deaktivovaný prídavkom 10 % H<sub>2</sub>O (Fluka, Bukurešť)
- komerčné dosky silikagél 60 GF<sub>254</sub>, (Merck, Praha)
- silikagél na prípravu nalievaných dosiek pre preparatívnu chromatografiu Kieselgel GF 254, (Merck, Praha)

#### 4.1.6 Prístrojové vybavenie

- vákuova odparka Büchi rotavapor R-114 (Büchi, Flaviil, Switzerland)
- ultrazvukový kúpeľ Sonorex Super 10P (Bandelin, Germany)
- chromatograf Agilent Technologies 7890A s hmotnostným detektorom Agilent Technologies 5975 (Agilent Technologies Santa Clara, California USA)

- spektrometer ESI-MS Thermo Finnigan LCQDuo (GenTech Scientific, Inc., New York, USA)
- spektrometer Varian Iniova 500 (Varian, USA)
- polarimeter P3000 (A. Krüss Optronic Germany)

## **4.2 Všeobecné postupy**

### **4.2.1 Príprava a čistenie rozpúšťadiel**

Všetky rozpúšťadla, ktoré boli pri práci používané, boli pred použitím prečistené destiláciou a následne skladované v hnedých stojatkách zo skla, aby boli chránené pred svetlom.

### **4.2.2 Odparovanie rozpúšťadiel**

Frakcie, obsahujúce rozpúšťadla, boli odparené na rotačnej vakuovej odparke za zníženého tlaku vo vodnom kúpeli pri teplote 40°C alebo prípadne boli dosušené v sklenených ampulkách vo vodnom kúpeli pomocou prúdu vzduchu.

### **4.2.3 Sušenie a uchovávanie izolovaných látok**

Získané odparené frakcie a izolované čisté látky boli dosušené vo vákuovom exsikátore nad silikagelom po dobu 24 hodín. Po dosušení boli následne uchovávané v chladničke pri teplote 2 – 8°C.

### **4.2.4 Príprava sklenených dosiek pre preparatívnu tenkovrstvú chromatografiu**

Sklenené dosky s rozmermi 15 × 15 cm, použité pre preparatívnu TLC, boli najskôr očistené od nečistôt a odmastnené chloroformom a etanolom. Suspenzia, zložená zo silikagélu (6,5 g) a z vody (22 ml) bola naliata a rozprestrená na celú plochu dosiek. Takto pripravené dosky sa sušili minimálne 24 hodín.

### **4.2.5 Stĺpcová chromatografia**

Stĺpcová chromatografia prebiehala skokovou elúciou. Kolona bola naplnená adsorbentom, ktorým bol oxid kremičitý – SiO<sub>2</sub> (0,063 – 0,2 mm), deaktivovaný prídavkom 10 % H<sub>2</sub>O a bola do nej nanosená vzorka vo forme rozteru.

#### **4.2.6 Tenkovrstvá chromatografia**

Tenkovrstvá chromatografia prebiehala štandardným spôsobom a to vo vyvíjaciach komorách, ktoré boli nasýtené parami mobilnej fázy. Po nanesení a odparení rozpúšťadiel boli do komôr vkladané komerčné hliníkové dosky s hrúbkou 0,2 mm, na ktorých boli nanesené vzorky. Po prikrytí vekom sa nechali dosky určitú dobu vyvíjať buď opakovane rovnakou mobilnou fázou alebo inou.

#### **4.2.7 Detekcia alkaloidov**

Detekcia alkaloidov bola uskutočnená najskôr pod UV lampou pri vlnovej dĺžke 254 nm a 366 nm, kde sa sledovala prítomnosť škvŕn, ktoré boli označené. Potom boli dosky postriekané Dragendorffovým činidlom na dôkaz prítomnosti alkaloidov, kedy v prípade ich prítomnosti došlo k oranžovému alebo oranžovo-žltému sfarbeniu škvŕn.

### **4.3 Analýza štruktúry**

#### **4.3.1 GC-MS analýza**

Hmotnostné spektrá boli namerané za použitia plynového chromatografu Agilent Technologies 7890A s hmotnostným detektorom Agilent Technologies 5975. Nosným plynom bolo Hélium 5.0 (Linde) a jeho prietok bol 0,8 ml/min. Nástrek bol pri teplote 280°C, objem nastreknutého alkaloidného roztoku bol 1 µl a split v pomere 1:10. Delenie prebiehalo na kolóne Agilent Technologies HP-5MS, 30m x 0,250 mm x 0,250 µm pri teplotnom programe 15°C/min zo 100°C do 180°C, 1 minútu bola teplota udržiavaná na 180°C a potom pri 5°C/min zo 180°C do 300°C, 40 minút bola teplota udržiavaná na 300°C. Pri 230°C prebehla elektrónová ionizácia 70 eV a fragmenty boli detekované v rozmedzí 40 – 60 m/z.

#### **4.3.2 ESI-MS analýza**

Hmotnostné spektrá boli merané spektrometrom LC/MS Thermo Finnigan LCQDuo s ionizáciou elektrosprejom v kladnom móde. Analyzátorom bola iontová pasta. Spektrá boli merané pri energii kolízie 40 eV. Alkaloidy boli rozpustené v metanole (0,5 mg/ml).



### 4.3.3 NMR analýza

NMR spektra  $^1\text{H}$ -NMR a  $^{13}\text{C}$ -NMR boli merané prístrojom Spektrometer Varian Iniova 500 pri teplote 25°C. Ako štandard bol použitý tetrametylsilan. Pracovná frekvencia jadier  $^1\text{H}$  bola 499,87 MHz a jadier  $^{13}\text{C}$  125,70 MHz. Chemické posuny ( $\delta$ ) boli vyjadrené v ppm (pars per milion).

### 4.3.4 Optická otáčavosť

Meranie optickej otáčavosti sa uskutočnilo na polarimetri P 3000 pri 25°C. Látky boli rozpustené v chloroforme. Optická otáčavosť bola vypočítaná podľa vzorca:

$$[\alpha]_D^t = \frac{100 \times \alpha}{c \times l}$$

$l$  — dĺžka kyvety [dm]

$t$  — teplota merania [°C]

$D$  — D-línie zo sodíkovej výbojky o  $\lambda = 589,3$  nm

$c$  — koncentrácia nameranej látky [g/l]

$\alpha$  — nameraná hodnota optickej otáčavosti [°C]

## 4.4 Izolácia alkaloidov

### 4.4.1 Rastlinný materiál

Vňať rastliny *Vinca minor* L. bola dodaná komerčne od predajcu Megafyt s.r.o (Vrané nad Vltavou) ako jemne rezaná droga. Verifikácia bola prevedená Prof. RNDr. Lubomírom Opletalom, CSc. Dokladové vzorky sú uložené v herbári Farmaceutickej fakulty Univerzity Karlovej.[78]

#### **4.4.2 Príprava alkaloidného extraktu a stĺpcová chromatografia predčisteného chloroformového výtrečku CHCl<sub>3</sub>-A**

Príprava a prečistenie alkaloidného extraktu a jeho následná stĺpcová chromatografia neboli náplňou mojej diplomovej práce. Vo svojej diplomovej práci som sa zaoberala izoláciou alkaloidov z pridelennej frakcie VM 323-327.

#### **4.4.3 Stĺpcová chromatografia frakcie VM 323-327**

Náplňou mojej diplomovej práce bola separácia alkaloidov z pridelennej frakcie VM 323 – 327

- **príprava rozteru:** 4,72 g alkaloidného extraktu sa rozpustilo v chloroforme a zmiešalo sa s 10 g adsorbentu SiO<sub>2</sub> a vo vodnom kúpeli bol chloroform odparený dosucha.
- **parametre kolóny:**

**ADSORBENT:** oxid kremičitý (SiO<sub>2</sub>), 0,063 – 0,2 mm, deaktivovaný prídavkom 10% H<sub>2</sub>O

**MNOŽSTVO ADSORBENTU:** 473 g

**MNOŽSTVO ADSORBENTU NA ROZTER:** 10 g

**VRSTVA S EXTRAKTOM:** 2,5 cm

**DELIACA VRSTVA:** 50 cm

**MŔTVY OBJEM:** 740 ml

**OBJEM FRAKCIE:** 100 ml

**DOBA TOKU FRAKCIE:** 20 min

**KONTROLNÁ TLC:** To : Et<sub>2</sub>NH (95:5), To : Et<sub>2</sub>NH (9 : 1)

Separácia alkaloidov prebiehala skokovitou elúciou za použitia mobilnej sústavy CHCl<sub>3</sub> + EtOH. Jednotlivé frakcie boli zbierané po 250 ml. Stĺpcovou chromatografiou sa celkovo získalo 66 frakcií, ktoré boli na základe monitorovania pomocou TLC a následným postriekaním Dragendorffovým činidlom spojené do 7 frakcií s celkovou hmotnosťou 4,54 g. (Tabuľka č.3)

Tabuľka 3 Stĺpcová chromatografia spojených frakcií VM 323 – 327

Číslo podfrakcie	Rozmedzie podfrakcie	Mobilná sústava	Hmotnosť podfrakcie (mg)
1	7 – 8	CHCl <sub>3</sub> + EtOH (97,5 : 2,5)	7,3
2	11 – 14	CHCl <sub>3</sub> + EtOH (97,5 : 2,5)	359
3	15 – 36	CHCl <sub>3</sub> + EtOH (97,5 : 2,5) CHCl <sub>3</sub> + EtOH (95 : 5)	684
4	37 – 47	CHCl <sub>3</sub> + EtOH (95 : 5)	1196
5	48 – 53	CHCl <sub>3</sub> + EtOH (95 : 5)	2079
6	54 – 59	CHCl <sub>3</sub> + EtOH (95 : 5)	71
7	60 – 81	CHCl <sub>3</sub> + EtOH (95 : 5) CHCl <sub>3</sub> + EtOH (9:1)	142



Obr. 17 TLC spojených podfrakcií alkaloidného extraktu frakcie VM 323 – 327

**TLC adsorbent:** SiO<sub>2</sub> 60 F254

**Mobilná fáza:** CHX : Et<sub>2</sub>NH : CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH (85 : 10 : 5)

**Počet vyvíjaní:** 1 x

**Detekcia:** Dragendorffovo činidlo

#### **4.4.4 Izolácia alkaloidov z frakcie č. 3 (15 – 36)**

Frakcia č. 3 s celkovou hmotnosťou 684 mg bola ďalej spracovávaná preparatívnou TLC. Frakcia bola nanesená na nalievané preparatívne TLC dosky o veľkosti 15 × 15 cm a vyvíjaná v mobilnej sústave CHX : CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub> : NH<sub>3</sub> (15 : 10 : 0,05). Separovala sa do 7 zón s hodnotami retenčných faktorov 0,86; 0,80; 0,73; 0,61; 0,46; 0,33; 0,17. Elúcia zlúčenín z adsorbentu bola prevedená CH<sub>3</sub>Cl<sub>3</sub> : EtOH v pomere 1 : 1. Ďalej bola spracovávaná len podfrakcia č. 6 s hmotnosťou 80 mg. S ostatnými frakciami sa ďalej nepracovalo, pretože to boli zmesi látok, ktoré sa nám nedostatočne oddelili alebo mali veľmi malú hmotnosť. Frakcia č. 4 sa javila ako nádejná na izoláciu alkaloidov, avšak po konečnom prečistení sme z jednej jej podfrakcie nezískali žiaden zisk a látka získaná z druhej jej podfrakcie nebola alkaloidnej povahy.

#### **Spracovanie frakcie č. 6**

Na 8 komerčných TLC doskách na SiO<sub>2</sub>o rozmeroch 20 × 10 cm bola nanesená podfrakcia č. 6 s celkovou hmotnosťou 80 mg a vyvíjala sa 3× v chromatografických komorách s mobilnou sústavou To : CHX : Et<sub>2</sub>NH v pomere 40 : 50 : 10. Získali sa dve zóny s látkami, ktoré sa osobitne vyškrabali, následne boli s prídavkom kremeliny eluované CHCl<sub>3</sub>+EtOH (1:1), odparili sa rozpúšťadlá a bola prevedená preparatívna TLC na SiO<sub>2</sub> na analytických doskách v mobilnej sústave EtOAc : MeOH : TFAA v pomere 40 : 10 : 0,1 v ktorej sa oddelili 2 látky 6/1 s hmotnosťou 15,8 g a 6/2 s hmotnosťou 24,5 g. Alkaloidy boli eluované zo silikagélu metanolom, ktorý bol následne odparený na vákuovej odparke. Jednotlivé zóny boli prečistené rozpustením v 2% HCl, vytrepané dietyléterom a následne boli roztoky alkaloidov alkalizované 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a vytrepané 4× do EtOAc. Prečistením podfrakcie 6/1 bola získaná amorfna látka MJ-1 s hmotnosťou 12,2 g a z podfrakcie 6/2 amorfna látka MJ-2 s hmotnosťou 8,5 g.

## 4.5 Stanovenie biologickej aktivity

### 4.5.1 Stanovenie cholinesterázovej aktivity

#### 4.5.1.1 Použité chemikálie

- acetylthiocholín jodid 98% (Sigma-Aldrich)
- butyrylthiocholín jodid (Sigma-Aldrich)
- dimetylsulfoxid (DMSO) (Sigma-Aldrich)
- 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoová kyselina  $\geq 98\%$  5mM roztok (DNTB) (Sigma-Aldrich)
- galantamín hydrobromid (Changsha Organic Hearb Inc., China)
- huperzín A (TAZHONGHUI– Tai'an zhonghui Plant Biochemical Co., Ltd., China)
- fyzostigmín (Sigma-Aldrich)

#### 4.5.1.2 Pufry

- fosfátový pufor 5mM, pH 7,4  
Zásobný roztok A: 10mM roztok  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (1 liter roztoku obsahuje 1,20 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )  
Zásobný roztok B: 10mM roztok  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (1 liter roztoku obsahuje 1,42 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )  
Pufor bol pripravený zmiešaním 57 ml roztoku A s 283 ml roztoku B a 300 ml vody.
- fosfátový pufor 5mM, pH 7,4 obsahujúci 150mM chloridu sodného  
8,766 g chloridu sodného p. a. bolo rozpusteného v 5mM fosfátovom pufre pH 7,4 a doplneného ním do 1000 ml.
- fosfátový pufor 100mM, pH 7,4  
Zásobný roztok A: 200mM roztok  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (1 liter roztoku obsahuje 24,0 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )  
Zásobný roztok B: 200mM roztok  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (1 liter roztoku obsahuje 28,4 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )  
Pufor bol pripravený zmiešaním 57 ml roztoku A s 243 ml roztoku B a 300 ml vody.

#### 4.5.1.3 Prístroje

- Centrifuga Boeco U-32 R (Boeco, Germany) a rotor Hettich 1611, (Hettich, Germany)
- Reader Synergy<sup>TM</sup> HT Multi-Detection Microplate Reader, (BioTek, USA)

#### **4.5.1.4 Biologický materiál**

Ako zdroj AChE bol použitý hemolyzát ľudských erytrocytov a zdrojom BChE bola ľudská plazma.

#### **4.5.1.5 Príprava hemolyzátu a plazmy**

Hemolyzát a plazma boli získané z čerstvo odobratej krvi, ktorá bola následne zmiešaná s citrónanom sodným, aby sa zabránilo jej zrážaniu. Krv bola rovnomerne po 5 ml rozdelená do skúmaviek. Vykonala sa centrifugácia pri rýchlosti 4000 rpm, pri 4°C po dobu 10 minút. Po centrifugácii sa plazma nad usadenými erytrocytmi odsaje a uchová sa k následnému stanoveniu aktivity BChE v chladničke pri 4°C.

Zvyšky plazmy z erytrocytárneho sedimentu sa odsali, odčítal sa objem erytrocytárnej masy a sediment bol zriedený 5mM fosfátovým pufróm s pH 7,4 s obsahom 150mM NaCl. Vzniknutá dostatočne premiešaná suspenzia bola rozdelená do skúmaviek a prebehla centrifugácia. Erytrocyty boli centrifugáciou premyté celkom 3x. Po odstránení premývacej kvapaliny k nim bol pridaný 5mM fosfátový pufr s pH 7,4 v pomere 1 : 9 (erytrocyty : fosfátový pufr). Táto zmes bola prevedená do Erlenmayerovej banky a erytrocyty sa nechali spontánne hemolyzovať za stáleho miešania na magnetickej miešačke po dobu 10 minút. Po skončení hemolýzy sa hneď zmerala aktivita hemolyzátu.

Následne bola stanovená absorbančia BChE v plazme (hodnota musí byť v rozmedzí 0,15 – 0,20) a absorbančia AChE v hemolyzáte (hodnota musí byť v rozmedzí 0,08–0,15). V prípade potreby bola hodnota absorbancie upravená potrebným množstvom 5mM fosfátového pufru s pH 7,4. Plazma a hemolyzát boli do doby použitia uchovávané pri -22°C.

#### **4.5.1.6 Stanovenie cholinesterázovej inhibičnej aktivity (IC50)**

Hodnoty inhibičnej aktivity boli stanovené pomocou Ellmanovej spektrofotometrickej metódy s použitím DTNB. Ako substráty boli použité estery tiocholínu, pre AChE acetylcholín, pre BChE butyrylcholín. Princíp metódy je založený na hydrolýze esterov tiocholínu cholinesterázou za vzniku žlté sfarbených produktov. Následne bol spektrofotometricky sledovaný nárast absorbancie po dobu 1 minúty pri  $\lambda = 436$  nm pre AChE a  $\lambda = 412$  nm pre BChE.

Do jamiek mikrotitračných doštičiek bolo napipetovaných 8,3 µl hemolyzátu alebo plazmy, pridalo sa 283µl 5 mM DTNB a 8,3µl skúšaného alkaloidu v DMSO v klesajúcej koncentrácii od 40,0; 10,0; 4,0; 1,0 až 0,4 mM. Zmes bola premiešavaná v mikrotrepačke po dobu 1 minúty a následne bola inkubovaná v komore readeru prístroja pri teplote 37°C po dobu 5 minút. Po inkubácii bolo k vzorkám pridaného 33,3 µl enzýmového substrátu (10mM acetyltiocholínjodidu alebo 10mM butyrylcholínjodidu) a po 2 minútach boli odčítané hodnoty absorbancie. Takto bolo zmeraných 6 radov pre každú koncentráciu stanovovanej látky vrátane DMSO ako slepej vzorky. Absorbancia bola meraná pri  $\lambda = 436$  nm pre AChE a pri  $\lambda = 412$  nm pre BChE. Hodnoty  $IC_{50}$  boli vypočítané z nameraných hodnôt poklesu aktivity AChE alebo BChE v programe GraphPad Prism. 50 % inhibičná aktivita bola vypočítaná podľa vzorca:

$$\% I = 100 - (\Delta A_{BL} / \Delta A_{SA}) * 100$$

% I – percentá inhibície

$\Delta A_{BL}$  – nárast absorbancie slepej vzorky za 1 minútu

$\Delta A_{SA}$  – nárast absorbancie meranej vzorky za 1 minútu

Zistená inhibičná aktivita  $IC_{50}$  AChE a BChE jednotlivých látok bola porovnaná s hodnotami  $IC_{50}$  štandardných látok (galantamín, huperzín A, fyzostigmín)

## 4.5.2 Stanovenie inhibície prolyl oligopeptidázy (POP)

### 4.5.2.1 Použité chemikálie

- Z-Gly-pro-*p*-nitroanilid (Sigma-Aldrich)  
Bol pripravený rozpustením látky v 40% 1,4-dioxanu a uchovávaný v chladničke pri 4°C.
- Z-Pro-prolinal
- Bajkalín

### 4.5.2.2 Prístroje

- Mikrotitračný detektor ELISA (Synergy 2-Vermont, USA)
- Software GraphPad Prism

#### 4.5.2.3 Stanovenie inhibičnej aktivity testovaných látok voči POP

Enzým POP bola rozpustená vo fosfátovom pufri s pH 7,4, ktorý obsahoval 137mM NaCl a 2,7 mM KCl. Špecifická aktivita POP bola 0,2 U/ml. Na stanovenie bola použitá štandardná polystyrenová 96jamková mikrotitračná dosička s plochým priehľadným dnom. Zásobné roztoky testovaných látok boli pripravené rozpustením v 10mM DMSO. Roztoky na testovanie boli pripravené nariedením týchto zásobných roztokov superčistou vodou. Kontrolný roztok mal rovnakú koncentráciu ako DMSO. Ako substrát POP bol použitý Z-Gly-pro-*p*-nitroanilid a rozpustený v 40% 10mM 1,4-dioxanu. V jamke mikrotitračnej dosky bolo zmiešaných 170  $\mu$ l pufri, 5 $\mu$ l roztoku testovanej látky a 5 $\mu$ l roztoku POP. Zmes v dosičke bola inkubovaná po dobu 5 minút, pri teplote 37°C, potom bolo do jamky pridaných 20 $\mu$ l substrátu a zmes bola opäť inkubovaná ďalších 30 minút pri teplote 37°C. Množstvo produktu *p*-nitroanilínu bolo priamo úmerné aktivite POP. Meranie sa uskutočnilo spektrofotometricky pri  $\lambda = 405$  nm na mikrotitračnom detektore ELISA (Synergy 2-Vermont, USA). Inhibičná aktivita testovaných látok bola vyjadrená ako IC<sub>50</sub>. Inhibičná aktivita IC<sub>50</sub> jednotlivých látok bola porovnávaná s IC<sub>50</sub> referenčných látok. Dáta sa vyhodnotili pomocou Software GraphPad Prism.



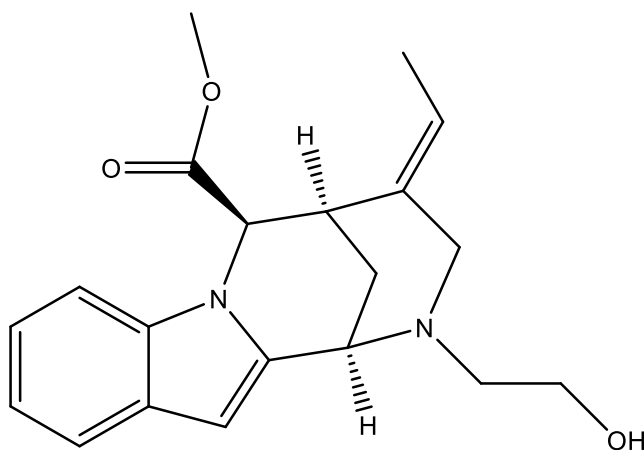
## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Štruktúrna analýza

Na základe výsledkov hmotnostnej spektrometrie MS, nukleárnej magnetickej rezonancie NMR, optickej otáčavosti a porovnania s literatúrou boli látka MJ-1 identifikovaná ako (–)-vinoxín a látka MJ-2 ako (±)-vinoxín.

#### 5.1.1 (–)-Vinoxin (MJ-1)

Popis: amorfná pevná látka, priesvitná, bez zápachu



Obr. 18 (–)-Vinoxín

##### 5.1.1.1 GC-MS analýza

Za daných podmienok meraní nebola zlúčenina na GS-MS detekovaná

##### 5.1.1.2 ESI-MS analýza

MS (ESI):  $m/z$  (%) =  $[M+H]^+$  280 (100), 341 (95), 220 (93), 205 (18), 251 (17), 225 (14), 424 (10), 395 (10)

##### 5.1.1.3 NMR analýza

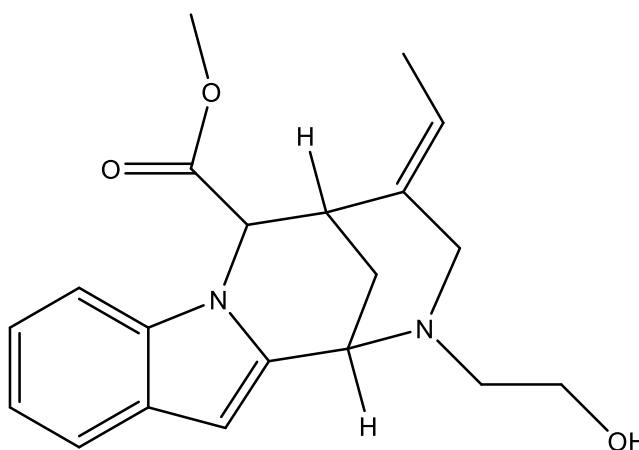
Spektrá boli porovnávané s literatúrou.[79]

#### 5.1.1.4 Optická otáčavosť

$[\alpha]_D^{25} = -98^\circ$  ( $c = 0,2$ ;  $\text{CHCl}_3$ ).

#### 5.1.2 ( $\pm$ )-Vinoxín (MJ-2)

Popis: amorfná pevná látka, priesvitná, bez zápachu



Obr. 19 ( $\pm$ )-Vinoxín

##### 5.1.2.1 GC-MS analýza

Za daných podmienok meraní nebola zlúčenina na GS-MS detekovaná

##### 5.1.2.2 ESI-MS analýza

MS (ESI):  $m/z$  (%) =  $[M+H]^+$ +280 (100), 341 (95), 220 (93), 205 (18), 251 (17), 225 (14), 424 (10), 395 (10)

##### 5.1.2.3 NMR analýza

Spektrá boli porovnávané s literatúrou.[79]

#### 5.1.2.4 Optická otáčavosť

$[\alpha]_D^{25} = 0^\circ$  ( $c = 0,2$ ;  $\text{CHCl}_3$ ).

## 5.2 Inhibičná aktivita izolovaných alkaloidov

Výsledky inhibície AChE, BChE a POP v prípade izolovaných alkaloidov MJ-1 a MJ-2 sú uvedené v nasledujúcej tabuľke. (Tabuľka č. 4 )

Tabuľka 4 Výsledky inhibičných aktivít izolovaných alkaloidov

Alkaloid	IC <sub>50</sub> (μM)		
	AChE	BChE	POP
(-)-vinoxín	>1000	24,61 ± 1,71	289,0 ± 11.0
(±)-vinoxín	>1000	27,39 ± 4,87	nemeriané
galantamín *	1,71 ± 0,07	42,30 ± 1,30	-
huperzín A *	33,01 ± 1,01 x 10 <sup>-3</sup>	>1000	-
Fyzostigmín *	63,05 ± 1,00 x 10 <sup>-3</sup>	130.0 ± 4,01 x 10 <sup>-3</sup>	-
Z-Pro-prolinal *	-	-	3.27 ± 0,02 x 10 <sup>-3</sup>
Bajkalín *	-	-	194.0 ± 14.01

\* galantamín, huperzín A, fyzostigmín, Z-Pro-prolinal, bajkalín – štandardy

## 6 DISKUSIA

Stĺpcovou chromatografiou bola frakcia VM 323-327 rozdelená do 7 spojených frakcií. Na základe TLC boli izolované 2 látky a na základe analýzy MS, NMR a optickej otáčavosti boli tieto látky identifikované ako (–)-vinoxín a (±)-vinoxín, ktoré patria podľa štruktúry do skupiny indolových alkaloidov. Podľa zistení z literatúry sa jedná o amorfné alkaloidy.[79] (–)-vinoxín bol už izolovaný v roku 1967 z rastliny *Vinca minor* L. (Apocynaceae).[80] Racemát vinoxínu pravdepodobne vznikol v priebehu spracovania extraktu. Z literárnych zdrojov bolo zistené, že izolované alkaloidy sa nevyskytujú v iných druhoch rodu *Vinca*.

U izolovaných alkaloidov bola stanovovaná inhibičná aktivita voči AChE, BChE a POP spektrofotometricky. Zistené hodnoty  $IC_{50}$  boli porovnané s hodnotami  $IC_{50}$  štandardných látok – galantamínu ( $IC_{50\text{ AChE}} 1,71 \pm 0,07$ ;  $IC_{50\text{ BChE}} 42,30 \pm 1,30$ ), huperzínu A ( $IC_{50\text{ AChE}} 33,01 \pm 1,01 \times 10^{-3}$ ;  $IC_{50\text{ BChE}} >1000$ ) a fyzostigmínu ( $IC_{50\text{ AChE}} 63,05 \pm 1,00 \times 10^{-3}$ ;  $IC_{50\text{ BChE}} 130,0 \pm 4,01 \times 10^{-3}$ ). (–)-vinoxín a (±)-vinoxín boli voči AChE neaktívne ( $> 1000 \mu\text{M}$ ), ale voči BChE vykazovali vysokú selektívnu inhibičnú aktivitu v porovnaní so štandardmi, (–)-vinoxín ( $24,61 \pm 1,71 \mu\text{M}$ ) a (±)-vinoxín ( $27,39 \pm 4,87 \mu\text{M}$ ). V dostupnej literatúre nebolo zistené či izolované alkaloidy boli testované na inhibíciu cholinesteráz v súvislosti s AD. V prípade (–)-vinoxínu a jeho racemátu sa získané hodnoty inhibície voči BChE nelíšili, izoméria u vinoxínu nehraje rolu vo výslednej aktivite voči BChE.

Na inhibičnú aktivitu voči POP nebol (–)-vinoxín meraný, pretože na to nebolo izolované dostatočné množstvo a (±)-vinoxín s  $IC_{50} 289,0 \pm 11,0$  nevykazoval výraznú aktivitu voči POP oproti štandardom – Z-Pro-prolinalu s  $IC_{50} 3,27 \pm 0,02 \times 10^{-3}$  a bajkalínu s  $IC_{50} 194,0 \pm 14,01$ .

Na základe výsledkov môžeme povedať, že izolované alkaloidy sú neaktívne voči AChE a POP, ale voči BChE vykazujú lepšiu inhibičnú aktivitu ako štandardy galantamín a huperzín A, štandard fyzostigmín oproti izolovaným alkaloidom signifikantne inhibuje AChE a BChE. Oba izolované alkaloidy vykazovali významnú a selektívnu inhibičnú aktivitu voči butyrylcholinesteráze a tieto látky sa môžu potenciálne uplatniť ako vedúce štruktúry pre vývoj liečiv u Alzheimerovej choroby.

## 7 POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Organization, W.H. *Dementia: a public health priority*; World Health Organization, 2012; ISBN 978-92-4-156445-8.
2. Patterson, C. World Alzheimer Report 2018—The State of the Art of Dementia Research: New Frontiers. **2018**.
3. A. Lima, J.; Hamerski, L. Alkaloids as Potential Multi-Target Drugs to Treat Alzheimer's Disease. In *Studies in Natural Products Chemistry*; 2018; pp. 301–334 ISBN 978-0-444-64183-0.
4. Murray, A.P.; Faraoni, M.B.; Castro, M.J.; Alza, N.P.; Cavallaro, V. Natural AChE Inhibitors from Plants and their Contribution to Alzheimer's Disease Therapy. *Curr Neuropharmacol* **2013**, *11*, 388–413.
5. Ahmed, F.; Ghalib, R.M.; Sasikala, P.; Ahmed, K.K.M. Cholinesterase inhibitors from botanicals. *Pharmacogn Rev* **2013**, *7*, 121–130.
6. ADINACO | Vědecký portál - Farmaceutická fakulta UK Available online: <https://portal.faf.cuni.cz/Groups/ADINACO/> (accessed on Jul 29, 2019).
7. Jahodář, L. *Farmakobotanika : semenné rostliny*; Praha : Karolinum, 2009; ISBN 978-80-246-1791-6.
8. Yilmaz, U. Alzheimer's disease. *Der Radiologe* **2015**, *55*, 386–388.
9. Majerníková, Ľ.; Cmorejová, V.; Klímová, E. Rodina a pacient s Alzheimerovou chorobou v kontexte potreby vytvárania medzigeneračných mostov. In; pp. 473–482.
10. What Is Alzheimer's Disease? Available online: <https://www.nia.nih.gov/health/what-alzheimers-disease> (accessed on Apr 17, 2019).
11. Mátl, O.; Mátllová, M.; Holmerová, I. *Zpráva o stavu demence 2014 : existují v krajích České republiky významnější rozdíly?*; Praha : Česká alzheimerovská společnost, o.p.s., 2014, 2014; ISBN 978-80-86541-34-1.
12. Types of Alzheimer's: Early-Onset, Late-Onset, and Familial Available online: <https://www.webmd.com/alzheimers/guide/alzheimers-types> (accessed on Apr 17, 2019).
13. *Textbook of Clinical Neurology*; G, G.M., Christopher, Ed.; 3 edition.; Saunders: Philadelphia, 2007; ISBN 978-1-4160-3618-0.

14. Prince, M.; Albanese, E.; Guerchet, M.; Prina, M. World Alzheimer's report 2014 Dementia and Risk Reduction an analysis of protective and modifiable factors. **2014**.
15. Nevšímalová, S.; Tichý, J.; Růžička, E. *Neurologie*; Praha : Galén : Karolinum, 2002, 2002; ISBN 978-80-246-0502-9.
16. Hulín, I.; Brunovský, A. *Patofyziológia*; Slovak Academic Press: Bratislava, 1996; ISBN 978-80-85665-62-8.
17. Jiráček, R. Diagnostika a terapie Alzheimerovy choroby. *Neurologie pro praxi* **2008**, 9, 240–244.
18. Jiráček, R.; Koukolík, F. *Dementia : neurobiologie, klinický obraz, terapie*; Galén: Praha, 2004; ISBN 978-80-7262-268-9.
19. Jiráček, R.; Borzová, C.; Holmerová, I. *Dementia a jiné poruchy paměti : komunikace a každodenní péče*; Sestra; Grada: Praha, 2009; ISBN 978-80-247-2454-6.
20. Martina, Z. *Alzheimerova demence*; Grada Publishing a.s.: Praha, 2017; ISBN 978-80-271-0561-8.
21. Mačák, J.; Mačáková, J. *Patologie*; Grada: Praha, 2004; ISBN 978-80-247-0785-3.
22. de Paula, V. de J.R.; Guimaraes, F.M.; Diniz, B.S.; Forlenza, O.V. Neurobiological pathways to Alzheimer's disease: Amyloid-beta, TAU protein or both? *Dement Neuropsychol* **2009**, 3, 188–194.
23. Serrano-Pozo, A.; Frosch, M.P.; Masliah, E.; Hyman, B.T. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2011**, 1, a006189.
24. Iqbal, K.; del C. Alonso, A.; Chen, S.; Chohan, M.O.; El-Akkad, E.; Gong, C.-X.; Khatoon, S.; Li, B.; Liu, F.; Rahman, A.; et al. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **2005**, 1739, 198–210.
25. Jiráček, R. Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Klinická farmakologie a farmacie* **2004**, 18, 212–214.
26. Giacobini, E. Cholinesterases: New Roles in Brain Function and in Alzheimer's Disease. *Neurochem Res* **2003**, 28, 515–522.
27. Jiráček, R. *Gerontopsychiatrie*; Galén: Praha, 2013; ISBN 978-80-7262-873-5.
28. Chlebek, J.; Korábečný, J.; Doležal, R.; Štěpánková, Š.; Pérez, D.I.; Hošťálková, A.; Opletal, L.; Cahlíková, L.; Macáková, K.; Kučera, T.; et al. In Vitro and In Silico Acetylcholinesterase

- Inhibitory Activity of Thalicttricavine and Canadine and Their Predicted Penetration across the Blood-Brain Barrier. *Molecules* **2019**, *24*.
29. Jiráček CSc, R. Současné trendy v kognitivní farmakoterapii Alzheimerovy choroby. *Psychiatrie pro praxi* **2005**, *3*, 55–58.
  30. Qian, Z.M.; Ke, Y. Huperzine A: Is it an Effective Disease-Modifying Drug for Alzheimer's Disease? *Front Aging Neurosci* **2014**, *6*.
  31. Drtinová, L.; Pohanka, M. Potentials of Huperzine A Use in Alzheimer Disease Treatment. *1* **2013**, *107*.
  32. Chlebek, J. Studium biologické aktivity alkaloidu izolovaných z *Corydalis cava* (Fumariaceae). doktorantská disertační, Univerzita Karlova: Praha, 2012.
  33. Fadaeinasab, M.; Basiri, A.; Kia, Y.; Karimian, H.; Ali, H.M.; Murugaiyah, V. New Indole Alkaloids from the Bark of *Rauvolfia Reflexa* and their Cholinesterase Inhibitory Activity. *CPB* **2015**, *37*, 1997–2011.
  34. Jiráček CSc, R. Současné trendy v biologické terapii Alzheimerovy choroby. *Psychiatrie pro praxi* **2006**, *7*, 8–11.
  35. Jiráček, R. Extractum Ginkgo biloba EGb761 a jeho využití v psychiatrii. *Neurologie pro praxi* **2018**, *19*, 15–18.
  36. Vališ, Mud.M.; Kalnická, Mud.D. Novinky ve farmakoterapii demencí. *Neurologie pro praxi* **2011**, *12*, 33–36.
  37. Vališ, M.; Caisberger, F.; Šimůnek, L.; Linková, H. Farmakoterapie demencí – pokroky v léčbě a aktuální doporučení. *Remedia* **2014**.
  38. Jiráček, doc Mud.R. Nové postupy v biologické terapii demencí. *Psychiatrie pro praxi* **2010**, *11*, 143–144.
  39. Siatka, T.; Adamcová, M.; Opletal, L.; Cahlíková, L.; Jun, D.; Hrabínová, M.; Kuneš, J.; Chlebek, J. Cholinesterase and Prolyl Oligopeptidase Inhibitory Activities of Alkaloids from *Argemone platyceras* (Papaveraceae). *Molecules* **2017**, *22*, 1181.
  40. PBT2 | ALZFORUM Available online: <https://www.alzforum.org/therapeutics/pbt2> (accessed on Jul 29, 2019).
  41. Daidalea Available online: <https://apps.faf.cuni.cz/daidalea/PlantFamily.asp?id=6> (accessed on Apr 10, 2019).

42. Koyuncu, M.; Ekşi, G.; Gençler Ozkan, A. *Vinca ispartensis* (Apocynaceae), a New Species from Turkey. *Annales Botanici Fennici* **2015**, *52*, 340–344.
43. VINCA MINOR L. – barvínek menší / zimozeleň menšia | BOTANY.cz.
44. barvínek menší - *Vinca minor* | Květena České republiky - plané rostliny ČR | [www.kvetenacr.cz](http://www.kvetenacr.cz) | Available online: <http://www.kvetenacr.cz/detail.asp?IDdetail=140> (accessed on Apr 19, 2019).
45. Herbář Wendys - *Vinca minor* - barvínek menší Available online: <https://botanika.wendys.cz/index.php/14-herbar-rostlin/7-vinca-minor-barvinek-mensi,%2020.4.2019> (accessed on Jul 28, 2019).
46. Kresánek, J.; Dugas, D. *Průručný atlas léčivých rostlin*; Osveta, 1985; ISBN 70-048-85.
47. Daidalea Available online: <https://apps.faf.cuni.cz/daidalea/PlantSpecies.asp?id=10024> (accessed on Apr 10, 2019).
48. Vachnadze, V.Yu.; Dzhakeli, É.Z.; Robakidze, Z.V.; Chkhikvadze, G.V.; Mudzhiri, M.M.; Abuladze, G.V.; Chuchulashvili, N.A. Chemical Composition and Pharmacological Activity of Alkaloids from the Common Periwinkle Cultured in Georgia. *Pharmaceutical Chemistry Journal* **2001**, *35*, 268–270.
49. Farahanikia, B.; Akbarzadeh, T.; Jahangirzadeh, A.; Yassa, N.; Shams Ardekani, M.R.; Mirnezami, T.; Hadjiakhoondi, A.; Khanavi, M. Phytochemical Investigation of *Vinca minor* Cultivated in Iran. *Iran J Pharm Res* **2011**, *10*, 777–785.
50. Spilková, J. *Farmakognozie*; Učební texty Univerzity Karlovy v Praze; Praha : Univerzita Karlova v Praze, nakladatelství Karolinum, 2016, 2016; ISBN 978-80-246-3264-3.
51. Zhu, X.; Zeng, X.; Sun, C.; Chen, S. Biosynthetic pathway of terpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus*. *Front. Med.* **2014**, *8*, 285–293.
52. Moudi, M.; Go, R.; Yien, C.Y.S.; Nazre, Mohd. *Vinca* Alkaloids. *Int J Prev Med* **2013**, *4*, 1231–1235.
53. Aronson, J.K. *Meyler's Side Effects of Drugs: The International Encyclopedia of Adverse Drug Reactions and Interactions*; Elsevier, 2015; ISBN 978-0-444-53716-4.
54. Malikov, V.M.; Yunusov, S.Yu. *Vinca* alkaloids. *Chem Nat Compd* **1977**, *13*, 497–512.
55. Bahadori, F. ISTANBUL TECHNICAL UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY. **2011**, 275.



56. Bahadori, F.; Topçu, G.; Boğa, M.; Türkekul, A.; Kolak, U.; Kartal, M. Indole Alkaloids from Vinca major and V. minor Growing in Turkey. *Natural Product Communications* **7**, 1934578X1200700.
57. Abouzeid, S.; Beutling, U.; Surup, F.; Abdel Bar, F.M.; Amer, M.M.; Badria, F.A.; Yahyazadeh, M.; Brönstrup, M.; Selmar, D. Treatment of Vinca minor Leaves with Methyl Jasmonate Extensively Alters the Pattern and Composition of Indole Alkaloids. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 2905–2909.
58. Mokřý, J.; Dúbravková, L.; Šefčovič, P. Alkaloide aus Vinca minor L. Vincadin, Minovin und Vincorin. *Experientia* **1962**, *18*, 564–565.
59. Shittu, H.; Gray, A.; Furman, B.; Young, L. Glucose uptake stimulatory effect of akuammicine from Picralima nitida (Apocynaceae). *Phytochemistry Letters* **2010**, *3*, 53–55.
60. Menzies, J.R.; Paterson, S.J.; Duwiejua, M.; Corbett, A.D. Opioid activity of alkaloids extracted from Picralima nitida (fam. Apocynaceae). *Eur. J. Pharmacol.* **1998**, *350*, 101–108.
61. Shang, J.-H.; Cai, X.-H.; Feng, T.; Zhao, Y.; Wang, J.; Zhang, L.; Yan, M.; Luo, X.-D. Pharmacological evaluation of Alstonia scholaris: anti-inflammatory and analgesic effects. *Journal of ethnopharmacology* **2010**, *129*, 174–181.
62. Levac, D.; Cázares, P.; Yu, F.; De Luca, V. A Picrinine N-Methyltransferase Belongs to a New Family of  $\gamma$ -Tocopherol-Like Methyltransferases Found in Medicinal Plants That Make Biologically Active Monoterpenoid Indole Alkaloids<sup>1</sup>[OPEN]. *Plant Physiol* **2016**, *170*, 1935–1944.
63. Reserpine (reserpine) dose, indications, adverse effects, interactions... from PDR.net Available online: <https://www.pdr.net/drug-summary/Reserpine-reserpine-792> (accessed on Aug 18, 2019).
64. Sturdíková, M.; Fuska, J.; Grossmann, E.; Votický, Z. New compounds with cytotoxic and antitumor effects. Part 6: Monomeric indole alkaloids of vinca minor L. and their effect on P388 cells. *Pharmazie* **1986**, *41*, 270–272.
65. Zhang, L.; Zhang, C.-J.; Zhang, D.-B.; Wen, J.; Zhao, X.-W.; Li, Y.; Gao, K. An unusual indole alkaloid with anti-adenovirus and anti-HSV activities from Alstonia scholaris. **2014**.

66. Guo, D.; Lu, X.; Xu, X.; Gou, H.; Wang, Z.; Cao, Y.; Luo, X. Therapeutic Effect of Vinorine on Sciatic Nerve Injured Rat. *Neurochem. Res.* **2018**, *43*, 375–386.
67. Wu, L.; Ye, M.; Zhang, J. Vincamine prevents lipopolysaccharide induced inflammation and oxidative stress via thioredoxin reductase activation in human corneal epithelial cells. *Am J Transl Res* **2018**, *10*, 2195–2204.
68. NCATS Inxight: Drugs — VINCAMINE Available online: <https://drugs.ncats.io/substance/996XVD0JHT> (accessed on Aug 18, 2019).
69. Willson, C. Vinpocetine☆. In *Reference Module in Biomedical Sciences*; Elsevier, 2015 ISBN 978-0-12-801238-3.
70. [Vinpocetin in neurological diseases]. - PubMed - NCBI Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23289173> (accessed on Aug 18, 2019).
71. Zhang, Y.; Li, J.; Yan, C. An update on Vinpocetine: New discoveries and clinical implications. *Eur J Pharmacol* **2018**, *819*, 30–34.
72. Vinpocetine Attenuates the Osteoblastic Differentiation of Vascular Smooth Muscle Cells. - PubMed - NCBI Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27589055> (accessed on Aug 18, 2019).
73. Kiss, B.; Kárpáti, E. [Mechanism of action of vinpocetine]. *Acta Pharm Hung* **1996**, *66*, 213–224.
74. Terpenoid Indole Alkaloids | Alkaloids from Plants | Medicinal Herbs | Botany | Biocyclopedia.com Available online: [https://biocyclopedia.com/index/medicinal\\_plants/alkaloids/terpenoid\\_indole\\_alkaloids.php](https://biocyclopedia.com/index/medicinal_plants/alkaloids/terpenoid_indole_alkaloids.php) (accessed on Aug 18, 2019).
75. Drug Delivery Systems and Combination Therapy by Using Vinca Alkaloids Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4997956/> (accessed on Aug 18, 2019).
76. Levêque, D.; Jehl, F. Clinical pharmacokinetics of vinorelbine. *Clin Pharmacokinet* **1996**, *31*, 184–197.
77. TLC\_Stains - TLC Visualization Reagents This is a brief selection of the many available TLC visualization reagents Below each title is the type of | Course Hero Available online: <https://www.coursehero.com/file/13098850/TLC-Stains/> (accessed on Aug 22, 2019).
78. Vítovcová, A. Biologická aktivita sekundárních metabolitů rostlin IV. Alkaloidy Vinca minor L. diplomová práce, Univerzita Karlova: Hradec Králové, 2016.

79. Votický, Z.; Grossmann, E.; Potier, P. Vinoxine, a novel type of indole alkaloid. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **1977**, *42*, 548–552.
80. Bennasar, M.-L.; Zulaica, E.; Alonso, Y.; Vidal, B.; Vázquez, J.T.; Bosch, J. Addition of chiral enolates to N-alkyl-3-acylpyridinium salts. Total synthesis of (+)-16-epivinoxine and (–)-vinoxine. *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13*, 95–106.

## 8 ABSTRAKT

Jurkaninová, M.: Alkaloidy *Vinca minor* L. a jejich biologická aktivita I. Diplomová práce, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky, Hradec Králové 2019,

Cieľom tejto diplomovej práce bola izolácia alkaloidov z vybranej podfrakcie č.3 (15-36), ktorá bola súčasťou frakcie VM 323-327. Tá bola získaná z predošlého spracovania alkaloidného extraktu z *Vinca minor* L. na našej katedre v rámci vypracovania diplomovej práce Anety Vítovcovej.[78]

Frakcia VM 323-327 bola separovaná stĺpcovou chromatografiou na silikagéle a bolo získaných celkom 7 podfrakcií. Následné opakované spracovanie vybranej podfrakcie č.3 (15-36) preparatívnou TLC na silikagéle viedlo k izolácii alkaloidov (–)-vinoxínu a jeho racemátu (±)-vinoxínu. Identifikácia štruktúry bola určená na základe MS, NMR a optickej otáčavosti.

U izolovaných látok bola stanovená inhibičná aktivita voči acetylcholinesteráze, butyrylcholinesteráze a prolyl oligopeptidáze. Inhibičná aktivita voči vybraným enzýmom bola meraná spektrofotometrickými metódami.

Izolované alkaloidy boli voči AChE a POP požadované ako neaktívne ( $IC_{50} > 1000 \mu M$ ), voči BChE vykazovali signifikantnú selektívnu aktivitu (–)-vinoxín ( $IC_{50} = 24,61 \pm 1,71$ ) a (±)-vinoxín ( $IC_{50} = 27,39 \pm 4,87$ ). Tieto látky by sa mohli potencionálne uplatniť ako prípadne „lead structures” vo vývoji nových liečiv u Alzheimerovej choroby.

Kľúčové slová: *Vinca minor* L., indolové alkaloidy, butyrylcholinesteráza, prolyl oligopeptidáza, Alzheimerova choroba

## 9 ABSTRACT

Jurkaninová, M.: *Vinca minor* L. alkaloids and their biological activity I. Diploma thesis, Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmaceutical Botany, Hradec Králové, 2019

The aim of this thesis was the isolation of alkaloids from selected fraction 3 (joined fractions (15 – 36), which was a sub-fraction of the fraction VM 323 – 327. It was obtained from the previous processing of an alkaloidal extract from the *Vinca minor* L at the Department of Pharmaceutical Botany as a part of elaboration of diploma thesis of Aneta Vítavcová.[78]

The fraction VM 323-327 was separated by column chromatography on silica gel and a totally, of 7 subfractions were obtained. Subsequent repeated processing of the selected sub-fraction 3 (15 – 36) by preparative TLC on silica gel resulted in the isolation of (–)-vinoxine and its racemate (±)-vinoxine. Identification of their structure was determined based on MS, NMR and optical rotation.

The inhibitory activity against acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and prolyl oligopeptidase were determined for the isolated substances. Inhibitory activity against selected enzymes was measured by spectrophotometric methods.

Isolated alkaloids were required to be inactive against AChE and POP ( $IC_{50} > 1000 \mu M$ ), against to BChE showed a significant selective activity (–)-vinoxín ( $IC_{50} = 24,61 \pm 1,71$ ) a (±)-vinoxín ( $IC_{50} = 27,39 \pm 4,87$ ). These substances could be potentially used as a „lead structures” in the development of new drugs in Alzheimer’s disease.

Keywords: *Vinca minor* L., indole alkaloids, butyrylcholinesterase, prolyl oligopeptidase, Alzheimer’s disease